

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA FREIRE DE OLIVEIRA

ESTUDO QUÍMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, BIOLÓGICAS,
ANTITUMORAL E HEPATOPROTETORA DAS PARTES AÉREAS DE *Croton*
glandulosus Linnaeus., Euphorbiaceae

CURITIBA

2020

LETÍCIA FREIRE DE OLIVEIRA

ESTUDO QUÍMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, BIOLÓGICAS,
ANTITUMORAL E HEPATOPROTETORA DAS PARTES AÉREAS DE *Croton*
glandulosus Linnaeus., Euphorbiaceae

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel.
Coorientadora: Dra. Cristiane Da Silva Paula Oliveira

CURITIBA

2020

Oliveira, Letícia Freire de

Estudo químico, propriedades antioxidantes, biológicas, antitumoral e hepatoprotetora das partes aéreas de *Croton glandulosus* Linnaeus., Euphorbiaceae [recurso eletrônico] / Letícia Freire de Oliveira – Curitiba, 2020.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientadora: Dra. Cristiane da Silva Paula Oliveira

1. Euphorbiaceae. 2. Vitexina. 3. Anti-hemolíticos. 4. Neutrófilos. 5. Antineoplásicos. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Oliveira, Cristiane da Silva Paula. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.321



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LETÍCIA FREIRE DE OLIVEIRA** intitulada: **ESTUDO QUÍMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, BIOLÓGICAS, ANTITUMORAL E HEPATOPROTETORA DAS PARTES AÉREAS DE *Croton glandulosus* Linnaeus., Euphorbiaceae.**, sob orientação da Profa. Dra. MARILIS DALLARMI MIGUEL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Fevereiro de 2020.


MARILIS DALLARMI MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora


LUCIANE DALLARMI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


ELIANA REZENDE ADAMI
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA UFPR)


JOSIANE DE FATIMA GASPARI DIAS
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e Nossa Senhora, por me dar forças nos momentos de fraqueza, esperanças nos momentos difíceis e me iluminar nos dias mais complicados e obscuros. A fé tem sido meu guia, escudo e fortaleza em todos os dias, durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná (UFPR), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e professores que contribuíram para meu crescimento profissional.

Em especial, à minha orientadora Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel, por ter me cedido a oportunidade de executar este projeto, pelos conhecimentos repassados, amizade, paciência e orientação.

Agradeço aos Professores Dr. Obdulio Gomes Miguel, Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias, Dra. Sandra Zanin, Dra. Cristiane Silva de Paula e Profa. Msc. Madalena, pelos momentos únicos em nosso laboratório e compartilhamento de seus conhecimentos sempre com muita disposição e paciência.

Agradeço aos meus amigos do grupo de pesquisa em produtos naturais, pelos momentos de descontração e apoio. E aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional.

Agradeço em especial, aos amigos que me auxiliaram em diversas análises: Carolina Sette, Beatriz Hirota, Angela Maria, Francis Merino, Vinicius Bednarczuk, Ranieri Campos, Luciana Gibbert, Eliane Adami, Fernando Betim, Gustavo Bellei, Juliana Swiech, Marina Piltz, Daniela Folquitto, Lismaíra Garcia, Patrícia Bachiega e Walmes Zeviani.

Agradeço aos alunos de iniciação científica, aos quais contribuíram para realização de alguns ensaios; Aline Bianchini, Marco Franceschini e Leonardo Gonçalves.

Agradeço aos meus amigos; Carolina Sette, Luciana Gibbert, Cristiane Paula, Marjory Menezes, Samantha D. Golin Pacheco e Marcela Bosio, pela amizade e por sempre me darem forças para continuar em uma cidade diferente, longe da família, onde a amizade torna-se muito importante, principalmente nos dias de angústias.

Agradeço à Profa. Dra. Graciele Campelo Borges, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, pela contribuição e parceria na realização do ensaio de ORAC. Ao Prof. Dr. Ângelo da Silva Cabral e alunos do Laboratório de Estatística Aplicada – LEA da UFPR, pela ajuda e suporte no delineamento estatístico.

Agradeço às professoras Dra. Alexandra Acco, Dra. Eliane Adami e aos alunos do grupo de pesquisa de metabolismo e toxicologia do Departamento de Farmacologia da UFPR,

pela parceria na realização dos testes farmacológicos, ao tempo dedicado para a realização deste trabalho, bem como a paciência e orientação.

Agradeço ao professor Dr. Paulo Wunder do Departamento de Farmácia da UFPR, pela contribuição e ensinamentos na realização dos ensaios imunológicos. Ao Professor Dr. Renato Silva de Sousa do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR, pelo apoio e suporte com as análises histológicas.

Agradeço à Professora Dra. Patrícia Maria Stuelp Campelo, à Profa. Dra. Selene Elifio Esposito do Program de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), e à aluna de iniciação científica Salloá Moura pela ajuda e apoio com os ensaios de viabilidade celular com neuroblastoma humano.

Agradeço ao Engenheiro Florestal do Museu Botânico Municipal de Curitiba, Marcelo Leandro Brotto pela identificação do material botânico.

Aos técnicos Graça, Paulo e Maurício, pelo auxílio e cordialidade. Também aos secretários Jean Godoi, Ednéia e Gustavo, pela pronta disposição nos atendimentos enquanto secretários da pós-graduação. Aos servidores e funcionários da Universidade Federal do Paraná, pela prestação de serviços que contribuíram nesta jornada.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pelos realização do ensaios de ressonância magnética nuclear e CG/MS.

Agradeço aos meus pais, Luiz Sérgio de Oliveira e Fátima Freire de Oliveira, que sempre estiveram presentes na minha formação como pessoa, e sempre me deram apoio na minha formação profissional. Ao meu irmão Rafael Freire de Oliveira e demais familiares e amigos, que tanto me incentivaram e torceram por mim. E em especial, ao meu namorado Hendrick E.V. de Sousa, pelos momentos de alegria, pelo amor, carinho, paciência e por sempre estar presente e me apoiando e incentivando os meus projetos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro (Código de Financiamento 001) e demais pessoas, que não foram citadas, mas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

SALMO 91

2 Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.

7 Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas não chegará a ti.

10 Nenhum mal te sucederá, nem praga alguma chegará à tua tenda.

11 Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos.

12 Eles te sustentarão nas suas mãos, para que não tropeces com o teu pé em pedra.

RESUMO

O gênero *Croton* pertencente à família Euphorbiaceae, possui substâncias ativas como terpenoides, flavonoides e alcaloides, sendo suas espécies frequentemente empregadas na medicina popular. A espécie *Croton glandulosus* L. é amplamente distribuída no continente Americano, principalmente no Brasil, encontrada nos mais diversos ambientes. É considerada uma planta daninha que possui a capacidade de produzir substâncias químicas, as quais apresentam-se interessantes para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a investigar a composição fitoquímica, realizar ensaios de toxicidade preliminar, avaliar as atividades biológicas e farmacológicas da espécie. O extrato etanólico e frações das partes aéreas demonstraram a presença de esteroides, triterpenos, polifenóis, flavonoides, taninos e cumarinas. Foi realizado o isolamento, identificação e quantificação do flavonoide vitexina, e a verificar o potencial alelopático e ausência de toxicidade preliminar. O extrato etanólico e frações apresentaram capacidade antioxidante, capacidade anti-hemolítica, ativação de neutrófilos humanos e redução da proliferação celular de neuroblastoma humanos, em ensaio de MTT. Ensaios farmacológicos com o extrato etanólico, fração acetato de etila e vitexina, demonstraram efeito antitumoral *in vivo* em modelo de tumor de Ehrlich, efeito hepatoprotetor e redução do estresse oxidativo, induzido por CCl₄. Dessa forma, verificou-se o potencial biológico e farmacológico da espécie, para aplicação em diversas áreas de interesse agrônomo, veterinário, cosmética, alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: Euphorbiaceae. Vitexina. Anti-hemolíticos. Neutrófilos. Antineoplásicos.

ABSTRACT

The genus *Croton* from Euphorbiaceae Family, has active substances such as terpenoids, flavonoids and alkaloids, and its species are frequently used in folk medicine. *Croton glandulosus* is widely distributed in the American continent, mainly in Brazil, found in many different environments. It is considered a weed without economic or physiological benefit for the population, however, this plant has the ability to produce allelopathic substances with interest in the study and development of new drugs. In this context, we investigate the phytochemical composition, preliminary toxicity potential, biological and pharmacological activities of the species. Isolation, identification and quantification of the flavonoid vitexina, present in the plant, were performed. The extracts and fractions of the aerial parts showed the presence of steroids, triterpenes, polyphenols, flavonoids, tannins and coumarins. Allelopathic potential and absence of preliminary toxicity were verified. Extracts and fractions showed antioxidant capacity and in sheep erythrocytes, action on human neutrophils and reduction of human neuroblastoma cell proliferation. Pharmacological tests with crude extract, ethyl acetate and vitexina isolated, demonstrated *in vivo* antitumor effect in Ehrlich tumor model, hepatoprotective effect and oxidative stress reduction. Thus, it was verified the biological and pharmacological potential of the species, with application in agronomic, veterinary, cosmetic, food and pharmaceutical areas.

Keywords: Euphorbiaceae. Vitexin. Antihemolytics. Neutrophils. Antineoplastics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	MAPA DA DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DO GÊNERO <i>Croton</i>	32
FIGURA 2 –	ESTRUTURAS BOTÂNICAS DE <i>Croton glandulosus</i>	34
FIGURA 3 –	<i>Croton glandulosus</i> COM DETALHE DAS GLÂNDULAS ACROPECIOLARES	35
FIGURA 4 –	MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>Croton glandulosus</i>	36
FIGURA 5 –	FLUXOGRAMA DOS PRINCIPAIS BLOCOS DE ESTUDO DO TRABALHO	41
FIGURA 6 –	ESPÉCIE DE <i>Croton glandulosus</i> DURANTE O FLORESCIMENTO	42
FIGURA 7 –	CURVA ANALÍTICA E EQUAÇÃO DA RETA DA ROTINA, NO ENSAIO DE DPPH	52
FIGURA 8 –	FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXANO EM SOXHLET MODIFICADO E FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES REALIZADAS COM O EXTRATO E FRAÇÕES	54
FIGURA 9 –	ENSAIO DE ALELOPATIA COM EM GERBOX	58
FIGURA 10 –	CURVA PADRÃO E EQUAÇÃO DA RETA DO TROLOX	62
FIGURA 11 –	CURVA PADRÃO E EQUAÇÃO DA RETA DO SULFATO FERROSO	65
FIGURA 12 –	CURVA PADRÃO E EQUAÇÃO DA RETA DO ÁCIDO ASCÓRBICO	67
FIGURA 13 –	CURVA PADRÃO E EQUAÇÃO DA RETA DO ÁCIDO GÁLICO	69
FIGURA 14 –	ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICAS	71
FIGURA 15 –	ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS QUALITATIVO	73
FIGURA 16 –	ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS QUANTITATIVO	74
FIGURA 17 –	CURVAS DE TG/TGA DE PARTES AÉREAS DE <i>C. glandulosus</i>	83
FIGURA 18 –	ESTRUTURA QUÍMICA DO β -CARIOFILENO (A), BICICLOGERMACRENO (B) E γ -AMORFENO (C)	88
FIGURA 19 –	CAPACIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. glandulosus</i>	89
FIGURA 20 –	PROCESSO DE ISOLAMENTO DO FLAVONOIDE	96
FIGURA 21 –	AMPLA ESPECTRO DE RMN ^1H (200 MHz) DA VITEXINA EM DMSO- d_6	97
FIGURA 22 –	ESPECTRO DE RMN ^1H (200 MHz) DA VITEXINA EM DMSO- d_6 E SUA ESTRUTURA QUÍMICA	98

FIGURA 23 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (200 MHz) DA VITEXINA EM DMSO- d_6 E SUA ESTRUTURA QUÍMICA	99
FIGURA 24 – GRÁFICO DA CURVA ANALÍTICA DE VITEXINA E EQUAÇÃO DA RETA.....	102
FIGURA 25 – ESPECTRO DE CLAE-UV DA VITEXINA	103
FIGURA 26 – CROMATOGRAMA GERAL DO PADRÃO VITEXINA EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	104
FIGURA 27 – CROMATOGRAMAS INDIVIDUAIS DO PADRÃO VITEXINA EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	105
FIGURA 28 – PICOS DE ABSORBÂNCIAS EM CLAE-UV DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i> COMPARADOS AO PADRÃO VITEXINA	108
FIGURA 29 – COMPRIMENTO DE ONDA DOS PICOS DE ABSORBÂNCIAS DO PADRÃO VITEXINA COMPARADO AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	108
FIGURA 30 – ESTRUTURA QUÍMICA DA VITEXINA E APIGENINA.....	110
FIGURA 31 – AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	111
FIGURA 32 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> TRATADA COM OS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	114
FIGURA 33 – CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> TRATADA COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	116
FIGURA 34 – ATIVIDADE ANTI-HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS SOBRE AÇÃO DO RADICAL AAPH.....	125
FIGURA 35 – ATIVAÇÃO QUALITATIVA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	127
FIGURA 36 – DEPOSITOS DE FORMAZAN EM MICROPLACA DE 96 POÇOS.....	128
FIGURA 37 – ATIVAÇÃO QUANTITATIVA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	129
FIGURA 38 – AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT DE NEUROBLASTOMA HUMANO BE-M17 TRATADO COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	131
FIGURA 39 - AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT DE NEUROBLASTOMA HUMANO CHLA-20 TRATADO COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	133

FIGURA 40 – EFEITO DO TRATAMENTO COM OS EXTRATOS E VITEXINA DE <i>C. glandulosus</i> NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRlich.....	135
FIGURA 41 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS COM EHRlich TRATADOS E NÃO TRATADOS.	137
FIGURA 42 – PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE CAMUNDONGOS COM EHRlich TRATADOS E NÃO TRATADOS.	138
FIGURA 43 – AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TUMOR EHRlich EM CAMUNDONGOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM MTX, EBR, FAC E VTX.....	140
FIGURA 44 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CAT (A), SOD (B) E GST (C) NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS	143
FIGURA 45 – NÍVEL DE GSH (A) E LPO (B) NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS	145
FIGURA 46 – ANÁLISES HISTOLÓGICAS DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS NORMAIS E INDUZIDOS À HEPATOTOXICIDADE COM CCl ₄	150

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - HIERARQUIA TAXONÔMICA DE <i>Croton glandulosus</i> L.	33
QUADRO 2 - ANÁLISE DE GRUPOS QUÍMICOS POR CCD.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	TRATAMENTO UTILIZADO NO MODELO EXPERIMENTAL PARA TUMOR DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS <i>SWISS</i>	77
TABELA 2 –	GRUPO DE ANIMAIS E TRATAMENTOS DO ENSAIO DE HEPATOPROTEÇÃO	79
TABELA 3 –	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS DAS PARTES AÉREAS DE <i>Croton glandulosus</i>	82
TABELA 4 –	DETERMINAÇÃO TERMOGRAVIMÉTRICA E GRAVIMÉTRICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>C. glandulosus</i>	84
TABELA 5 –	COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO 20% DE <i>C. glandulosus</i>	85
TABELA 6 –	COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO 20% DE <i>C. glandulosus</i>	85
TABELA 7 –	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. glandulosus</i> ...	87
TABELA 8 –	CAPACIDADE ALELOPÁTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. glandulosus</i>	90
TABELA 9 –	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. glandulosus</i>	92
TABELA 10 –	RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES A PARTIR DO EXTRATO BRUTO DE <i>C. glandulosus</i>	93
TABELA 11 –	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE GRUPOS QUÍMICOS DO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i> EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	94
TABELA 12 –	DADOS DE DESLOCAMENTO DO ESPECTRO DE ¹ H RMN (200 MHz) DA VITEXINA EM DMSO- <i>d</i> ₆ E DADOS DA LITERATURA	100
TABELA 13 –	DADOS DE DESLOCAMENTO DO ESPECTRO DE ¹³ C RMN (200 MHz) DA VITEXINA EM DMSO- <i>d</i> ₆ E DADOS DA LITERATURA	101
TABELA 14 –	TEOR DE VITEXINA NAS FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	101
TABELA 15 –	TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORBÂNCIAS DA VITEXINA E PICOS NO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	108
TABELA 16 –	ENSAIO DE TOXICIDADE EM <i>Artemia salina</i> , DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	111
TABELA 17 –	ENSAIO LARVICIDA DA FRAÇÃO HEXÂNICA EM <i>Aedes aegypti</i>	118

TABELA 18 – RESULTADOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	118
TABELA 19 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E CORRELAÇÃO DE PEARSON, DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>C. glandulosus</i>	120
TABELA 20 – PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TUMOR DE EHRLICH.	137
TABELA 21 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO TUMOR DE EHRLICH TRATADOS E NÃO TRATADOS.....	139
TABELA 22 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TRANSAMINASE DE ALANINA SÉRICA (ALT), ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST) E FOSFATASE ALCALINA (ALP), TEOR DE CREATININA E GLICOSE EM CAMUNDONGOS INDUZIDOS E NÃO INDUZIDOS A HEPATOTOXICIDADE POR CCl ₄	141
TABELA 23 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM CCl ₄	147
TABELA 24 – PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM CCl ₄	148

LISTA DE SIGLAS

%AA	– Porcentagem de Atividade Antioxidante
%G	– Porcentagem de Germinação
%G	– Porcentagem de Germinação
AA	– Ácido Ascórbico
AAPH	– Dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)
AAR	– Atividade Antioxidante Relativa
ABAP	– Dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)
ABTS	– 2,2'-Azino-bis (3-Etilbenzotiazolin) 6-Ácido Sulfônico
ALP	– Fosfatase Alcalina
ALT	– Alanina Transaminase
ANOVA	– Análise de Variância
AST	– Aspartato Transaminase
ASTM	– <i>The American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
AUC	– Área Sob a Curva
BE-M17	– Linhagem Celular de Neuroblasma Humano
BHT	– Hidroxitolueno Butilado
BOD	– <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
BSA	– Albumina do Soro Bovino
C18	– Coluna Octadecilsilano
CAT	– Catalase
CCD	– Cromatografia em Camada Delgada
CDC	– Centro de Controle de Doença
CDNB	– 1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno
CE ₅₀	– Concentração Efetiva para 50%
CG	– Cromatografia Gasosa
CG-MS	– Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectro de Massas
CHLA-20	– Linhagem celular de Neuroblasma Humano
CIM	– Concentração Inibitória Mínima
CL ₅₀	– Concentração Letal para 50%
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta

CLO	– Fração Clorofórmica (Soxhlet)
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	– Dimetilsulfóxido Deuterado
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DPPH	– 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazila
DTG	– Termogravimetria Derivada
EAG	– Equivalente de Ácido Gálico
EBR	– Extrato Etanólico Bruto (Soxhlet)
EDTA	– Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FAC	– Fração Acetato de Etila (Soxhlet)
FAE	– Fração Acetato de Etila (Fitoquímica preliminar)
FBS	– Soro Fetal Bovino
FCL	– Fração Clorofórmica (Fitoquímica preliminar)
FHX	– Fração Hexânica (Fitoquímica Preliminar)
FOSFO	– Fosfomolibdênio
FRAP	– <i>Ferric Reducing Anti-oxidant Power</i>
FRE	– Fração Residual (Fitoquímica Preliminar)
GRAN	– Granulócitos
GSH	– Glutathione Reduzida
GST	– Glutathione S-transferase
HB	– Hemoglobina
HCM	– Hemoglobina Corpuscular Média
HCT	– Hematócrito
HepG2	– Carcinoma Hepatocelular
HEX	– Fração Hexânica (Soxhlet)
IRc	– Índice de Retenção Calculado
IRt	– Índice de Retenção
IVG	– Índice de Velocidade de Germinação
LINFO%	– % Linfócitos
LPO	– Peroxidação Lipídica
MBM	– Museu Botânico Municipal
MCHC	– Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
MCV	– Volume Corpuscular Médio

MET	– Metanol
MHB	– Meio Mueller-Hinton
MHz	– Megahertz
MIC	– <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MONO%	– % Monócitos
MTT	– (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
NAC	– N-acetilcisteína
NAC+	– N-acetilcisteína (CCl ₄)
NAIVE	– Grupo Controle
NBT	– Tetrazólio Nitroazul
NETs	– <i>Neutrophil Extracelullar Traps</i>
NEU	– Difenilboriloxietilamina 1% (metanol), polietilenoglicol 4000 5% (etanol)
NIST-14	– <i>National Institute of Standards and Technology-14</i>
OES	– Óleo Essencial
ORAC	– Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio
P.A.	– Para Análise
PBS	– <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCK	– Proteína Quinase C
PLAQ	– Plaquetas
PMA	– Acetato Miristato de Forbol
ppm	– Partes Por Milhão
psi	– <i>Pound per square inch</i> (unidade de pressão)
QND	– Sulfato de Quinidina
qsp	– Quantidade Suficiente Para
RBC	– Eritrócitos
RDW	– Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos
RES	– Fração Residual (Soxhlet)
RMN	– Ressonância Magnética Nuclear
ROS	– Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	– Rotação por minuto
RPMI-1640	– Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RUT	– Rutina
S	– <i>South</i> (Sul)

SAP	– Saponina
SE	– Solução Estoque
SEs	– Soluções Estoque
SISGEN	– Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SOD	– Superóxido dismutase
SPSS	– <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TG	– Termogravimetria
TMS	– Tetrametilsilano
TPC	– Compostos Fenólicos Totais
TPTZ	– [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina]
TR	– Tempo de retenção
TTC	– Cloreto Trifenil Tetrazolio
U	– Unidade de atividade enzimática
UEPG	– Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFC	– Unidades Formadoras de Colônias
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
USDA	– <i>United States Department of Agriculture</i>
UV	– Ultravioleta
v.o	– Via oral
VEH	– Veículo (água ou CCl ₄)
VTX	– Vitexina
W	– <i>West</i> (Oeste)
WBC	– Leucócitos totais

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	–	Absorbância
Eq.	–	Equivalente
i.p.	–	Intraperitoneal
min	–	Minuto
n°	–	Número
v.o	–	Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	–	Micrograma
μL	–	Microlitro
μM	–	Micromolar
μm	–	Micrômetro
μmol	–	Micromol
$\cdot\text{O}_2$	–	radicais superóxido
^{13}C	–	Carbono 13
^1H	–	Hidrogênio 1
$^1\text{O}_2$	–	oxigênio singlete
$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	–	Acetato de Etila
C_7H_8	–	Tolueno
CCl_4	–	Tetracloreto
CH_2O_2	–	Ácido fórmico
CH_3OH	–	Metanol
CHCl_3	–	Clorofórmio
cm^2	–	Centímetro quadrado
CO_2	–	Dióxido de Carbono
Fe^{2+}	–	Íon Ferroso
Fe^{3+}	–	Íon Férrico
G	–	Grama
H	–	Hidrogênio
H_2O	–	Água
H_2O_2	–	Peróxido de Hidrogênio
H_2SO_4	–	Ácido Sulfúrico
HCl	–	Ácido Clorídrico
He	–	Hélio
KCl	–	Cloreto de Potássio
Kg	–	Kilograma
KH_2PO_4	–	Fosfato Monopotássico
KOH	–	Hidróxido de Potássio
L	–	Litros

M	–	Molar
M	–	Metros
m/m	–	Massa por massa
m/z	–	Massa (m) sobre a carga
mg	–	Miligrama
mL	–	Microlitros
mM	–	Milimolar
mm	–	Milímetros
Mo (V)	–	Molibdênio (V)
Mo (VI)	–	Molibdênio (VI)
N	–	Normal
Na ₂ HPO ₄	–	Fosfato dissódico
NaCl	–	Cloreto de Sódio
NaOH	–	Hidróxido de Sódio
NH ₄ OH	–	Hidróxido de Amônio
nm	–	Nanômetro
nM	–	Nanomolar
O ₂	–	Oxigênio Molecular
V	–	Volts
v/v	–	Volume por volume
xg	–	Unidades de Gravidade
Zn	–	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.2	OBJETIVOS	29
1.2.1	Objetivo geral	29
1.2.2	Objetivos específicos	29
2.	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	ASPECTOS BOTÂNICOS: FAMÍLIA, GÊNERO E ESPÉCIE	31
2.2	PLANTAS INVASIVAS OU INFESTANTES	36
2.3	GRUPOS FITOQUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO <i>Croton</i>	38
3.	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1.	BLOCOS DE ESTUDOS	41
3.2	IDENTIFICAÇÃO, DEPÓSITO DE EXSICATA E COLETA DE <i>Croton glandulosus</i>	41
3.3	CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL SECO	42
3.3.1	Determinação do teor de umidade e de cinzas	42
3.3.2	Estudo termoanalítico	43
3.4	ENSAIO SISTEMÁTICO DE FITOQUÍMICA PRELIMINAR	43
3.4.1	Preparo do extrato aquoso a 20%	43
3.4.1.1	Pesquisa de heterosídeos antociânicos	43
3.4.1.2	Pesquisa de heterosídeos saponínicos	44
3.4.1.3	Pesquisa de heterosídeos cianogênicos	44
3.4.1.4	Pesquisa de taninos	44
3.4.1.5	Pesquisa de amino grupos	44
3.4.1.6	Pesquisa de ácidos fixos	44
3.4.1.7	Pesquisa de ácidos voláteis	45
3.4.2	Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%	45
3.4.2.1	Pesquisa de alcaloides	45
3.4.2.2	Pesquisa de leucoantocianidinas	46
3.4.2.3	Pesquisa de flavonoides	46
3.4.2.4	Pesquisa de cumarinas	47
3.4.2.5	Pesquisa substâncias iridoidais	47
3.4.2.6	Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos	47

3.4.2.7	Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos	48
3.5	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. glandulosus</i> : ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS	48
3.5.1	Extração do óleo essencial de <i>C. glandulosus</i>	48
3.5.2	Caracterização química do óleo essencial de <i>C. glandulosus</i>	49
3.5.3	Ensaio de toxicidade preliminar do óleo essencial	49
3.5.3.1	Ensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	49
3.5.3.2	Avaliação da capacidade hemolítica em eritrócitos de carneiro	50
3.5.3.3	Avaliação da capacidade alelopática em <i>Lactuca sativa</i>	50
3.5.4	Capacidade antioxidante total do óleo essencial de <i>C. glandulosus</i>	51
3.5.4.1	Avaliação da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH	51
3.5.4.2	Avaliação da capacidade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio.	52
3.6	ESTUDOS QUÍMICOS DO EXTRATO E FRAÇÕES <i>C. glandulosus</i>	53
3.6.1	Preparo do material vegetal e obtenção do extrato bruto etanólico	53
3.6.2	Fracionamento do extrato etanólico de <i>C. glandulosus</i>	53
3.6.3	Pesquisa de grupos químicos por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) do extrato e frações de <i>C. glandulosus</i>	54
3.6.4	Isolamento e identificação de substâncias puras da fração acetato de etila de <i>C. glandulosus</i>	55
3.6.4.1	Isolamento de substâncias químicas da fração acetato de etila de <i>C. glandulosus</i> ..	55
3.6.4.2	Identificação das substâncias puras isoladas da fração acetato de etila de <i>C. glandulosus</i>	55
3.6.5	Quantificação da vitexina e Fingerprint do extrato e frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta (CLAE-UV).	56
3.7	ESTUDOS BIOLÓGICOS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	56
3.7.1	Avaliação da letalidade de <i>Artemia salina</i> do extrato e frações	56
3.7.2	Avaliação da capacidade hemolítica do extrato e frações	57
3.7.3	Avaliação da capacidade alelopática em <i>Lactuca sativa</i> dos extratos e frações	57
3.7.4	Avaliação da capacidade larvicida em <i>Aedes aegypti</i> do extrato hexânico	58
3.7.5	Avaliação da atividade antimicrobiana pelo ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e frações	59
3.7.5.1	Avaliação da atividade antibacteriana do extrato e frações	60

3.7.5.2	Atividade antifúngica do extrato e frações	60
3.7.5.3	Interpretação dos resultados.....	61
3.8	ESTUDOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>C. glandulosus</i>	61
3.8.1	Capacidade de captura do Radical DPPH do extrato e frações.....	61
3.8.2	Captura do cátion radical ABTS do extrato e frações.....	62
3.8.3	Poder de Redução do Ferro (FRAP) do extrato e frações.....	64
3.8.4	Ensaio de ORAC (Capacidade de absorção de radicais de oxigênio) do extrato e frações	65
3.8.5	Capacidade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio.....	66
3.8.6	Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteau	68
3.8.7	Teste estatístico de Correlação de Pearson	70
3.9	ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>C. glandulosus</i>	70
3.9.1	Ensaio antioxidante em eritrócitos de carneiro induzido por AAPH, das frações acetato de etila e residual	71
3.9.1.1	Preparo da solução de eritrócitos	71
3.9.1.2	Avaliação da capacidade hemolítica induzida por AAPH.....	71
3.9.2	Ensaio de verificação de ânions superóxidos em neutrófilos humanos tratados com vitexina.....	72
3.9.2.1	Separação dos neutrófilos	72
3.9.2.2	Teste de verificação de ânions superóxidos em neutrófilos humanos qualitativo ...	73
3.9.2.3	Teste de verificação de ânions superóxidos em neutrófilos humanos quantitativo..	73
3.9.3	Ensaio de viabilidade celular por MTT de neuroblastoma humanos utilizando-se extrato e frações de <i>C. glandulosus</i>	75
3.9.3.2	Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT.....	75
3.10	ENSAIOS DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS <i>IN VIVO</i> DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E VITEXINA.....	76
3.10.1	Avaliação da atividade antitumoral em modelo experimental de tumor de Ehrlich em camundongos <i>Swiss</i> tratados com extrato bruto, fração acetato de etila e vitexina.....	76
3.10.1.1	Animais	76
3.10.1.2	Inoculação do tumor sólido de Ehrlich	76

3.10.1.3	Avaliação da atividade antitumoral dos extratos e vitexina no modelo de carcinoma sólido de Ehrlich:	77
3.10.1.4	Análise estatística.....	78
3.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA E EFEITO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR CCL ₄ EM CAMUNDONGOS <i>SWISS</i>	78
3.11.1	Animais	78
3.11.2	Teste de hepatoproteção e tratamento	79
3.11.3	Análise de hemograma e parâmetros bioquímicos	80
3.11.4	Parâmetros do estresse oxidativo	80
3.11.5	Análise estatística.....	81
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1	CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL SECO	82
4.2.2	Estudo termoanalítico	82
4.3	ENSAIO SISTEMÁTICO DE FITOQUÍMICA PRELIMINAR	84
4.4	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. glandulosus</i> : ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS	86
4.4.1	Extração e caracterização química do óleo essencial.....	87
4.4.2	Atividades biológicas e capacidade antioxidante do óleo essencial	88
4.5	ESTUDOS QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	93
4.5.1	Teor de sólidos solúveis e rendimento do extrato bruto e frações	93
4.5.2	Pesquisa de grupos químicos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	93
4.5.3	Isolamento e identificação de substâncias puras da fração acetato de etila	96
4.5.4	Fingerprint dos extratos e frações por CLAE-UV	103
4.6	ESTUDOS BIOLÓGICOS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>C. glandulosus</i>	110
4.6.1	Avaliação da toxicidade preliminar dos extratos e frações.....	110
4.7	ESTUDOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>C. glandulosus</i>	119
4.7.1	Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos extratos e frações das partes aéreas de <i>C. glandulosus</i>	119
4.8	ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>C. glandulosus</i>	124
4.8.1	Ensaio antioxidante em eritrócitos de carneiro induzido por AAPH.....	124

4.8.2	Ensaio de verificação de ânions superóxidos em neutrófilos humanos	127
4.8.3	Ensaio de viabilidade celular por MTT de neuroblastoma humanos.....	130
4.9	ENSAIOS DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS <i>IN VIVO</i> DO EXTRATO EBR, FRAÇÃO FAC E VITEXINA.	134
4.9.1	Avaliação da atividade antitumoral em modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich em camundongos <i>Swiss</i>	135
4.9.2	Avaliação da atividade hepatoprotetora e efeito sobre o estresse oxidativo induzido por CCl ₄ em camundongos <i>Swiss</i>	141
5.	CONCLUSÕES	152
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	155
	REFERÊNCIAS.....	156
	ANEXO 1.....	193
	ANEXO 2.....	194
	ANEXO 3.....	195

1 INTRODUÇÃO

A Euphorbiaceae é conhecida por seu rico potencial econômico e está entre as mais diversas e complexas famílias do grupo das Angiospermas. No âmbito industrial é representado pela seringueira (*Hevea brasiliensis*), no madeireiro representado pela Sangra d'água (*Croton matourensis* Aubl.), no nutricional representado pela Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e no ornamental pelo Bico-de-Papagaio (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) (JÚNIOR et al., 2018).

Em sua composição, a família Euphorbiaceae apresenta substâncias fitoquímicas, que conferem à algumas de suas espécies a capacidade antimicrobiana, alelopática, antioxidante, antitumoral, antiinflamatório, antimalárica, cicatrizante, gastroprotetor, antidiarreica, anti-neuroinflamatório, dentre outras atividades farmacológicas que estão reportadas em artigos científicos, patentes e em estudos etnobotânicos (CHASE et al., 2002; TREASE; EVANS, 2002; WURDACK et al., 2005; MIGUEL et al., 2014; MONGALO; SOYINGBE; MAKHAFOLA, 2019; MULUYE et al., 2019; SMERIGLIO et al., 2019; ZAYEDE; MULAW; KAHALIW, 2020; ZHOU et al., 2020).

O gênero *Croton* é um dos mais numerosos desta família, possui substâncias ativas como terpenoides, flavonoides e alcaloides, sendo as espécies deste gênero frequentemente empregadas na medicina popular (BRAGA, 1960; MACIEL et al., 2000; JONES, 2003; LUKA et al., 2020). Muitas espécies deste gênero são produtoras de óleos essenciais, compreendendo em sua composição química, principalmente, fenilpropanoiodes e terpenoides (mono e sesquiterpenos) (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007; ERESANYA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020).

Muitos estudos têm demonstrado capacidade antioxidante, potencial antitumoral, antiproliferativa, antimicrobiana, cardioprotetora, antimalárica e anti-isquêmica, em espécies *Croton* (LOPES; LOPES et al., 2004; ALONSO-CASTRO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012; AFRIYIE et al., 2013; ARRAIS et al., 2014; MOHAMMED; ERKO; GIDAY, 2014; DÍAZ et al., 2019; URRUTIA-HERNÁNDEZ et al., 2019; ARAÚJO et al., 2020; AYZA; BALASUBRAMANIAN; BERHE, 2020).

Dentre as espécies deste gênero, a *Croton glandulosus* é um arbusto amplamente distribuída no território nacional e possui habitat de anual a perene e caules geralmente herbáceos. Popularmente conhecida como Carvão-branco, Gervão-branco ou Erva peluda, é caracterizada como planta daninha ou planta invasora (SILVA et al., 2010a; THE PLANT LIST 2013; FLORA BRASIL, 2018; SIBBR, 2018).

As plantas daninhas, possuem a capacidade de produzir, estocar e liberar ao ambiente, substâncias alelopáticas ou fitotoxinas (INOUE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Dentre os principais compostos alelopáticos, destacam-se: taninos, glicosídeos, alcaloides, terpenos, flavonoides e ácidos fenólicos, que proporcionam a descoberta de diversas substâncias orgânicas, com potencial biológico e farmacológico (BRAZ-FILHO, 1994; TUR; BORELLA; PASTORINI, 2010). O estudo dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas são fontes importantes de compostos naturais biologicamente ativos que podem ser explorados como protótipos de inúmeros fármacos (BRAZ-FILHO, 1994; WALL; WANI, 1996).

Neste contexto, a espécie *Croton glandulosus*, é uma erva daninha sem relatos de estudos de suas propriedades biológicas e farmacológicas até o momento. No entanto, a planta possui crescimento vantajoso frente a condições ambientais precárias, devido aos seus aleloquímicos, além de sua ampla distribuição territorial (TORRES, 2009; THE PLANT LIST 2013; SIBBR, 2018). Em vista destas características, optou-se pela escolha da espécie para realização de estudos de sua composição química e seu potencial terapêutico.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Investigar a composição fitoquímica do óleo essencial, extrato etanólico e frações das partes aéreas de *C. glandulosus*. Avaliar a toxicidade preliminar, propriedades antioxidantes e biológicas; e ação antitumoral, hepatoprotetora e redutora do estresse oxidativo *in vivo*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar cadastro no SISGEN, coleta, identificação e depósito das excisas do material vegetal de *C. glandulosus*;
- Avaliar parâmetros de controle de qualidade, como umidade, cinzas e análise térmica das folhas de *C. glandulosus*;
- Realizar o estudo fitoquímico preliminar do extrato bruto etanólico e aquoso das partes aéreas de *C. glandulosus*;
- Realizar a extração do óleo essencial das partes aéreas de *C. glandulosus*, bem como análise de composição química por Cromatografia Gasosa acoplada a espectro de Massas (CG-MS);
- Preparar o extrato etanólico e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e fração residual das partes aéreas de *C. glandulosus*;
- Realizar estudos químicos do extrato, frações e composto isolado, por Cromatografia em Camada Delgada (CCD); Cromatografia líquida de alta eficiência com detector Ultravioleta (CLAE-UV); Colunas cromatográficas e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C ;
- Avaliar a toxicidade preliminar do extrato, frações e óleo essencial, por meio dos ensaios de letalidade em *Artemia salina*; hemólise e alelopatia;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato e frações, pelo ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM);
- Avaliar o potencial larvicida da fração hexânica em *Aedes aegypti*;

- Avaliar o potencial antioxidante do óleo essencial, por meio da capacidade sequestrante do radical livre difenil-picrilhidrazila (DPPH•) e redução do complexo fosfomolibdênio;
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato e frações, por meio da capacidade sequestrante do DPPH•; Captura do cátion radical ABTS; redução do ferro (FRAP); redução do complexo fosfomolibdênio e sequestro do radical peroxil pelo método ORAC;
- Avaliar o teor de compostos fenólicos totais, do extrato e frações por meio de análise colorimétrica de Folin-Ciocalteu;
- Avaliar a correlação entre o teor de compostos fenólicos e potencial antioxidante do extrato e frações, por meio de teste estatístico de correlação de Pearson;
- Avaliar o potencial anti-hemolítico em eritrócitos de carneiro submetidos à hemólise pelo radical AAPH, tratados previamente com a fração acetato de etila e residual;
- Realizar o ensaio de verificação de ânions superóxidos em neutrófilos humanos com o composto isolado vitexina;
- Avaliar a viabilidade celular de neuroblastoma humano, do extrato e frações, por meio do ensaio de MTT;
- Avaliar a ação antitumoral em camundongos *Swiss* inoculados com o tumor de Ehrlich, tratados com o extrato bruto, fração acetato de etila e vitexina;
- Avaliar o potencial hepatoprotetor do extrato bruto, fração acetato de etila e vitexina, em camundongos *Swiss* induzidos à hepatotoxicidade por CCl₄;
- Avaliar o peso relativo dos órgãos, parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos de camundongos inoculados com o tumor de Ehrlich e camundongos induzidos à hepatotoxicidade por CCl₄;
- Avaliar o estresse oxidativo hepático dos camundongos induzidos à hepatotoxicidade por CCl₄ tratados com extrato bruto, fração acetato de etila e vitexina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS: FAMÍLIA, GÊNERO E ESPÉCIE

A Euphorbiaceae, uma das maiores famílias das Angiospermas, está distribuída principalmente em regiões pantropicais, sendo constituída de cerca de 300 gêneros e aproximadamente 7000 espécies encontradas principalmente no continente Africano e Americano (WEBSTER, 1986; WEBSTER, 1994; CHASE et al., 2002; SOUZA; LORENZI, 2005; WURDACK et al., 2005; JUDD et al., 2009; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2018).

Contabiliza-se que o Brasil se apodera de cerca de 1100 espécies e 72 gêneros, sendo que, somente no estado de São Paulo, por exemplo, há ocorrência de cerca 37 gêneros, 160 espécies e 17 espécies endêmicas da caatinga (GOVAERTS et al. 2000; SAMPAIO et al., 2002; CARUZO; CORDEIRO, 2007; SOUZA; LORENZI, 2008).

As espécies dessa família, possuem hábitos variados e incluem desde ervas, subarbustos, árvores, trepadeiras e até algumas suculentas, com folhas inteiras ou partidas (JUDD, 1999). Geralmente, apresentam-se latescentes, monóicas ou dióicas, com flores diclinas, onde as flores pistiladas são caracterizadas pelo gineceu sincárpico, ovário súpero e geralmente tricarpelar. O fruto apresenta-se na forma capsular, com deiscência explosiva e abertura em três mericarpos, conhecido como cápsula tricoca (SÁTIRO; ROQUE, 2008).

É comum, também, a presença de glândulas localizadas em diferentes partes vegetativas e reprodutivas das plantas, sendo muito útil na identificação dos táxons (RADCLIFF-SMITH, 2001). A Euphorbiaceae apresenta grande diversidade morfológica e diferentes tipos de tricomas são observados, entre eles: tricomas simples, glandulares, malpigiáceos, estrelados, lepidotos, fasciculados, dentríticos e urticantes. Dentro desta família, cinco subfamílias são observadas, Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae. Na subfamília Crotonoideae, é frequente a presença de tricomas simples, estrelados, dentríticos ou lepidotos (WEBSTER, 1994; LUCENA; SALES, 2006).

As plantas desta família são muito utilizadas popularmente como cicatrizantes e também, no tratamento do reumatismo, tosse, úlcera, doenças respiratórias infecciosas, no tratamento do câncer, inflamações e dores (OLIVER, 1960; AGUIAR; BARROS, 2012; ISLAM et al., 2019). Diversos relatos científicos, também têm demonstrado atividades antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, antidearreica (ALI et al., 2020; CAVALCANTE et al., 2020; TCHANGOUE et al., 2020; ZAYEDE; MULAW; KAHALIWI, 2020). Ademais,

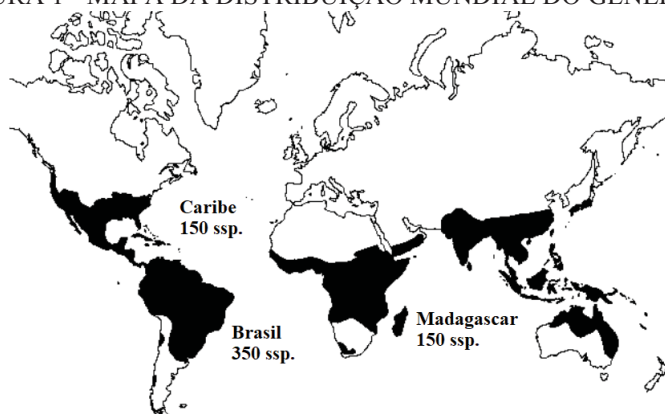
muitas de suas espécies possuem ação biológica e farmacológica, devido aos componentes químicos intrínsecos, como diterpenoides, triterpenoides, alcaloides e flavonoides (KHAN, 1979; TREASE; EVANS, 2002; ISLAM et al., 2019; BASU et al., 2020; LAN; YEN; LEU, 2020).

A Euphorbiaceae, também apresenta importância econômica, como a espécie africana *Ricinus communis* L, no qual as sementes são utilizadas na produção do óleo de rícino e de biodiesel, e a espécie *Hevea brasiliensis*, conhecida como seringueira da Amazônia que é utilizada na produção de borracha (SOUZA; LORENZI, 2008).

O gênero *Croton* foi proposto em 1753, por Linnaeus, que descreveu 13 espécies na Ásia e África, na primeira edição de *Species plantarum* (SILVA et al., 2010b). Pertencente à subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae, é um dos gêneros mais numerosos da Euphorbiaceae, sendo largamente estudado pela comunidade científica no Brasil e no exterior, não somente do ponto de vista taxonômico clássico, mas também, da sistemática filogenética (HOEHNE, 1939; FARNSWORTH; BLOMSTER; MESMMER, 1969; SECCO et al., 2012).

O *Croton* compreende 1300 espécies de distribuição pantropical (FIGURA 1), possui crescimento predominante no continente americano, ocorrendo desde o centro e sudeste dos Estados Unidos até a Argentina (GOVAERTS et al., 2000; BERRY et al., 2005; SECCO et al., 2012).

FIGURA 1 - MAPA DA DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DO GÊNERO *Croton*.



FONTE: Berry et al. (2005).

NOTA: As áreas demarcadas em preto demonstram a presença do gênero *Croton*.

As espécies de *Croton*, são frequentemente subarbustivas ou arbustivas, monóicas e ocasionalmente, arbóreas (BERRY et al., 2005; SILVA et al., 2010a). Na identificação botânica, podem ser reconhecidas, principalmente, pela presença de tricomas estrelados ou aciculares, inflorescências longas ou condensadas, látex, glândulas peciolares e limbo alaranjado quando senescentes (BERRY et al., 2005).

Geralmente, as plantas arbustivas deste gênero, possuem crescimento rápido e por isso investem em defesas qualitativas, o que pode ocasionar a metabolização de alcaloides e terpenoides (COLEY et al., 1985; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Neste contexto, algumas substâncias do metabolismo secundário têm sido isoladas de suas espécies, e dentre elas pode-se citar a trans-desidro Crotonina, um terpenoide obtido da *Croton cajucara* Benth., da qual estudos comprovaram efeitos hipolipêmico e hipoglicêmico (MACIEL et al., 2000).

O Brasil dispõe de cerca de 700 espécies de *Croton*, que são comumente utilizadas na medicina popular para tratar diversas enfermidades (HOEHNE, 1939; BERRY et al., 2005; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). No estado do Rio de Janeiro, cerca de 39 espécies foram relatadas em uso popular e muitas aplicações medicinais, incluem a atividade antitumoral (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007; ISLAM et al., 2019). Os extratos de "sangue-de-dragão" (*Croton lechleri* Müll. Arg.), utilizados por curandeiros "shaman" como remédios antidiarreicos em pacientes com AIDS (JONES, 2003). O óleo extraído de *Croton tiglium* L. é frequentemente utilizado pelos povos antigos, como purgante potente. A espécie de *Croton cajucara* Benth está entre as mais estudadas desse gênero, conhecida como 'sacaca' ou 'sangra d'água' é originária da região Amazônica brasileira. Suas cascas e folhas são geralmente dispostas na forma de chás e pílulas, empregadas no tratamento de diabetes, hipercolisteremia, distúrbios gastrointestinais e hepáticos (CAMPOS et al., 2002).

Dentre as espécies de *Croton*, a *Croton glandulosus* L. (QUADRO 1), popularmente conhecida como Carvão-branco, Gervão-branco ou Erva peluda, é um arbusto caracterizado como planta daninha ou planta invasora (SIBBR, 2018).

QUADRO 1 - HIERARQUIA TAXONÔMICA DE *Croton glandulosus* L.

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta (Plantas vasculares)
Superdivisão	Spermatophyta (Plantas com sementes)
Divisão	Magnoliophyta (Plantas com flores)
Classe	Magnoliopsida (Dicotiledôneas)
Subclasse	Rosidae
Ordem	Euphorbiales
Família	Euphorbiaceae
Subfamília	Crotonoideae
Tribo	Crotoneae
Gênero	<i>Croton</i> L.
Espécie	<i>Croton glandulosus</i> L.

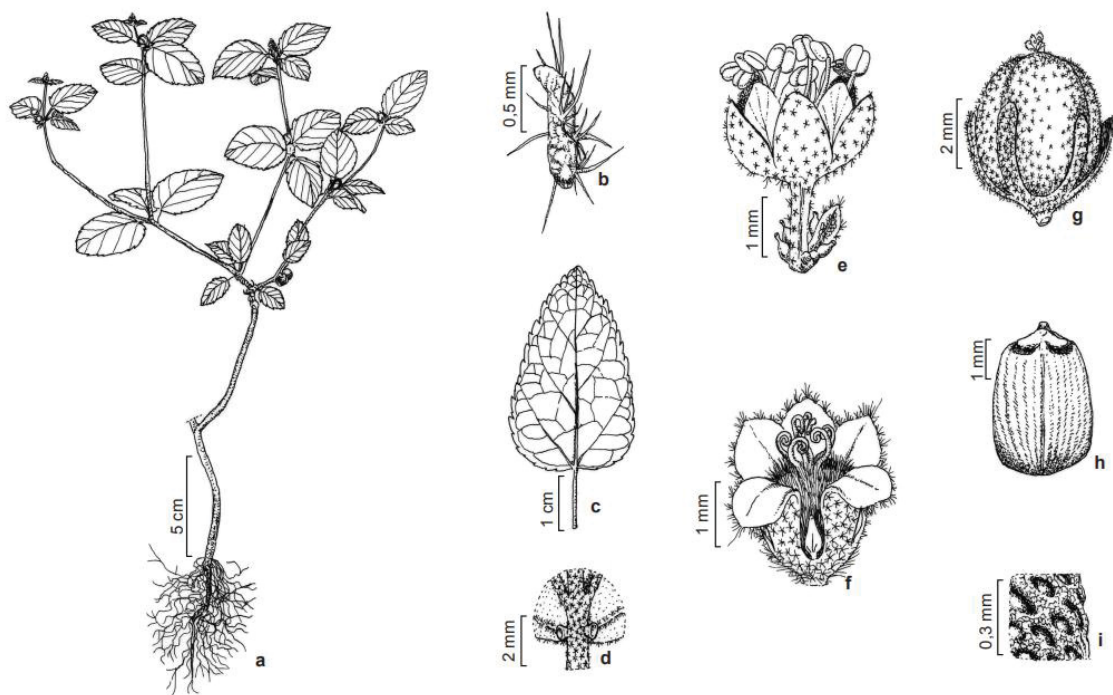
FONTE: USDA (2018).

Possui como sinônimas; *Croton klotzschii*, *Brachystachys hirta*, *Croton floridanus*, *Croton lundianus*, *Croton affinis*, *Croton corchorifolius*, *Croton divaricatus*, *Oxydectes glandulosa*, *Oxydectes glandulosa* var. genuína (THE PLANT LIST 2013; SIBBR, 2018).

Apresenta-se como uma planta monoica, possui habitat de anual a perene, pode crescer de 15 a 60 cm de altura e seus caules são geralmente herbáceos, mas muitas vezes se tornam um pouco lenhosos (USEFUL TROPICAL PLANTS, 2014).

Como características botânicas (FIGURA 2), exibe caules com tricomas estrelados nos ramos jovens. Folhas com pecíolos curtos; lâminas foliares ovais/elípticas; face adaxial e abaxial com tricomas estrelados; nervação camptódroma; margens serrilhadas; glândulas nectaríferas acropetiolares sésseis ou subsésseis; estípulas na porção apical de ramos jovens não foliáceas. Inflorescência em tirso com címulas proximais unissexuais; posição terminais, flores estaminadas curtamente pediceladas; que apresentam-se na forma estaminadas rotáceas; flores pistiladas sésseis/subsésseis; cálices das flores pistiladas dialissépalo; estiletes bífidos; lobos dos cálices das flores pistiladas iguais; pétalas das flores pistiladas filiformes e pré-floração das flores pistiladas valvares. Por fim, os frutos são columelas com lobos apicais pouco diferenciados (LUCENA; AMORIN; ALVES, 2009; FLORA DO BRASIL, 2018).

FIGURA 2 - ESTRUTURAS BOTÂNICAS DE *Croton glandulosus*



FONTE: Adaptado de Sodre et al. (2014).

NOTA: a. hábito; b. estípula; c. folha; d. detalhe das glândulas acropetiolares; e. flor estaminada; f. flor pistilada; g. fruto; h. semente; i. detalhe da superfície da semente.

Muito provavelmente, esta espécie possui o nome de *glandulosus*, devido à presença de glândulas em sua estrutura morfológica. Glândulas parecidas com coléteres, foram descritas em alguns gêneros de Euphorbiaceae, como *Croton* (SÁ-HAIAD, 2009). Os coléteres são definidos como estruturas secretoras, presentes na superfície adaxial dos órgãos

vegetativos e reprodutivos. Estruturalmente, podem aparecer como tricomas multicelulares, emergências ou glândulas vascularizadas. Na planta, são responsáveis por produzir uma secreção mucilagínosa com a finalidade de proteger estes, em processo de diferenciação, contra a dessecação. Estas glândulas também produzem uma secreção lipofílica, que atua como dissuasivo contra micro-organismos (FAHN 1990; KRONESTEDT-ROBARDS; ROBARDS, 1991; RIO et al., 2002; RIO et al., 2005).

Observações de campo, demonstraram a presença de uma glândula externa (FIGURA 2, d) no eixo inflorescente de *C. glandulosus*, cujo exsudado pegajoso, é coletado por diferentes insetos fitófagos, incluindo abelhas Meliponinae. Além disso, no pecíolo é evidenciado um par de glândulas acropeciolas, como demonstrado na FIGURA 3.

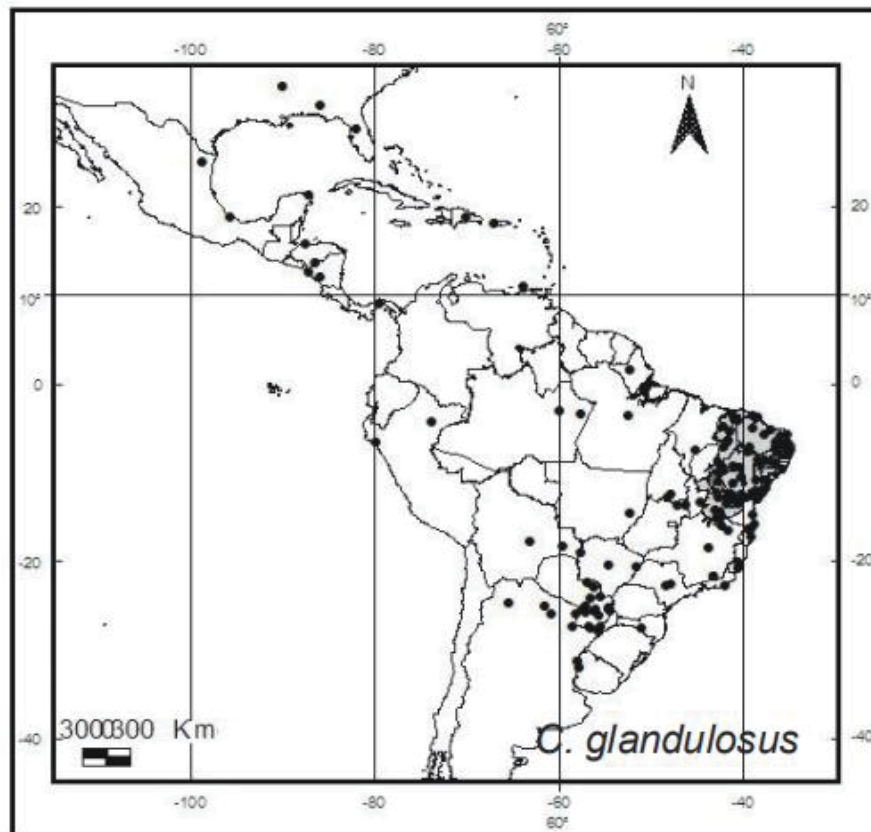
FIGURA 3 - *Croton glandulosus* COM DETALHE DAS GLÂNDULAS ACROPECIOLARES



FONTE: Ogrzewalska (2017).

NOTA: O círculo na FIGURA está evidenciado um par de glândulas acropeciolas no pecíolo da espécie.

No Brasil a *C. glandulosus* é distribuída em todos os estados, amplamente encontrada nos mais diversos biomas, como cerrado, caatinga, campos rupestres, Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta de Igapó, Floresta de Terra Firme, Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila, Manguezal, Restinga, Savana Amazônica, ruderais e áreas cultivadas (SILVA et al., 2010a; FLORA BRASIL, 2018; SIBBR, 2018). Há ainda, ocorrências de espécies registradas em vegetação arbustiva aberta, em solos arenosos ou argilosos e no sopé da serra de Itabaína, Sergipe, próximo ao riacho dos negros (LUCENA; AMORIN; ALVES, 2009). Em sua disposição global, inclui extensa distribuição no continente Americano (FIGURA 4), entendendo-se do México até a Argentina (CARABIA, 1942).

FIGURA 4 - MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *Croton glandulosus*

FONTE: Torres (2009).

NOTA: Os pontos pretos no mapa demonstram a presença de *C. glandulosus* no território.

2.2 PLANTAS INVASIVAS OU INFESTANTES

Algumas plantas têm a capacidade de germinar espontaneamente em áreas de interesse humano e interferir prejudicialmente nas atividades agropecuárias, sendo denominadas de plantas daninhas (BLANCO, 1972). Pode-se ainda, denominá-las de plantas invasoras, infestantes ou adventícias. Apesar destes termos serem frequentemente utilizados, apenas remetem a ideia do deslocamento da planta de sua área original de distribuição geográfica, não as relacionando diretamente, com a indesejabilidade no local (PITELLI, 2015).

A expressão planta daninha é comumente adotada e está relacionada ao fato destes seres vivos causarem danos às atividades humanas, principalmente agrícolas, e também, por causarem danos à saúde do homem e ao meio ambiente. Quando ocorrem fora de sua distribuição geográfica, ou em tamanhos populacionais acima do suporte do ambiente, estas são conhecidas como plantas parasitas, exóticas invasoras, pioneiras, trepadeiras, entre outras denominações (PITELLI, 2015).

Estas plantas interferem na produtividade ou na qualidade do produto colhido e caracterizam-se pela alta rusticidade, resistência a pragas e doenças, habilidade de produzir grande número de sementes viáveis, facilidade de disseminação das sementes, pela capacidade de desenvolver-se em condições adversas, como déficit hídrico, salinidade, solos ácidos ou alcalinos e temperaturas pouco propícias (VASCONCELOS; SILVA; LIMA, 2012).

Geralmente, as espécies de plantas daninhas são altamente competitivas, invasoras e dominantes, em relação a plantas nativas (MURRELL et al., 2011). Constituem sério problema na produção de culturas econômicas, pela competição por luz, umidade, espaço, água e nutrientes e também, por multiplicarem o inoculo garantindo a manutenção de organismos patogênicos (VOLL, 2005). Essa competição acontece quando o ambiente não consegue suprir as quantidades de compostos essenciais para o crescimento normal de uma população de plantas (SANTOS et al., 2010).

Logo, a ocorrência dessas plantas em sistemas agrícolas, pode levar a redução da produtividade das culturas, resultando em prejuízos que podem chegar à perda total da lavoura e elevando o custo da produção com decréscimos na produtividade (FORMAGIO et al., 2011). Além disso, elas geram maior custo de manutenção da cultura econômica, aborto em vacas ou morte do gado pela ingestão de plantas tóxicas (PITELLI, 1989). Isso ocorre devido à capacidade que estas plantas possuem, em produzir, estocar e liberar ao ambiente, substâncias químicas com propriedades alelopáticas, que são um dos fatores mais importantes que impõem limitações no desenvolvimento da atividade agrícola mundial (INOUE et al., 2010).

O poder alelopático dessas plantas, pode contribuir para o controle de outras plantas daninhas por meio de exsudatos, lixiviados e compostos voláteis. No entanto, esta influência pode afetar outras culturas por meio de atrasos de germinação de sementes ou redução do crescimento das culturas (OLIVEIRA JUNIOR; CONSTANTIN, 2001). Segundo Fontes (2003), a intensidade dessa interferência depende das características da espécie de planta daninha, da cultura, velocidade de crescimento, porte e arquitetura da planta, estágio de crescimento, duração do período de convivência e ambiente.

Um importante mecanismo ecológico, que influencia o tipo de vegetação existente em um ecossistema é a interação alelopática, que poder levar a dominância de uma determinada vegetação interferindo no manejo e produtividade de culturas econômicas. Os compostos químicos produzidos pelas plantas, que participam da atividade alelopática, são chamados aleloquímicos, substâncias aleloquímicas ou, ainda, fitotoxinas e são produtos do

seu metabolismo secundário (OLIVEIRA et al., 2011; ASRORI; SASAMOTO; OGITA, 2020; MUSHTAQ et al., 2020).

Segundo Pitelli (1989), esses aleloquímicos podem ser produzidos por qualquer parte da planta, como raízes, parte aérea, sementes em processo germinativo e até mesmo durante o processo de decomposição da palha. Sua composição em uma planta sofre influência de diversos fatores como temperatura, umidade, índice de precipitação, radiação e variação sazonal (VIECELLI; CRUZ-SILVA, 2009). Dentre os principais compostos com atividades alelopáticas, destacam-se: taninos, glicosídeos, alcaloides, terpenos, flavonoides e ácidos fenólicos (TUR; BORELLA; PASTORINI, 2010; INAYAT; ZAHIR MUHAMMAD; MAJEED, 2020; NANDI; HAFSAH, 2020).

2.3 GRUPOS FITOQUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO *Croton*

Substâncias químicas com propriedades medicinais, extraídas de diversos vegetais, têm estimulado o estudo químico e biológico de plantas e outros produtos naturais. Dentre estes compostos resultantes do metabolismo das plantas, pode-se dividir dois grandes grupos; os produtos do metabolismo primário, que são os carboidratos, lipídios e proteínas, e os do metabolismo secundário, que incluem os terpenos, alcaloides, flavonoides, glicosídeos, entre outros (MATOS, 1997; SIMÕES, 2017).

O metabolismo secundário de plantas dá origem a compostos que não possuem uma distribuição universal nos vegetais, pois não são necessários a todas as plantas (PERES, 2004). Os produtos desse metabolismo não são essenciais para o desenvolvimento do vegetal, mas são importantes para a sobrevivência de uma determinada espécie dentro de um ecossistema, viabilizando a adaptação do indivíduo no ambiente, respondendo pelas relações e interações entre planta-ambiente (MONTANARI JUNIOR, 2002).

Por sua vez, a pesquisa fitoquímica tem por finalidade investigar os constituintes químicos das espécies vegetais, contribuindo significativamente para o estudo de plantas que não dispõe de dados sobre sua composição química (SILVA et al., 2010b; SIMÕES, 2017). Além disso, o estudo do metabolismo secundário dos produtos naturais, proporciona a descoberta de diversas substâncias orgânicas com atividades biológicas, que dependem da investigação farmacológica (BRAZ-FILHO, 1994).

No âmbito farmacêutico, a busca por substâncias químicas capazes de prevenir e curar enfermidades vem sendo investigado desde os primórdios da existência humana. A cura através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de uso dos

produtos naturais pelo homem (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Neste contexto, as plantas são uma fonte importante de compostos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a síntese de inúmeros fármacos e protótipos a fármacos (WALL; WANI, 1996).

Dessa forma, a pesquisa de plantas com propriedades medicinais tem contribuído significativamente para o fortalecimento da indústria farmacêutica. Entretanto, as substâncias bioativas de origem vegetal não possuem propriedades de absorção e distribuição ideais para que se tornem um fármaco. Entretanto, suas estruturas químicas podem ser modificadas por meio de alterações a níveis moleculares, racionalmente planejadas na estrutura deste protótipo, em um projeto de química medicinal (NIERO et al., 2003).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários, os terpenos, os compostos fenólicos e os alcaloides. Os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são originários do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (PERES, 2004).

Muitas espécies de *Croton* são produtoras de um grande número de substâncias pertencente às classes dos alcaloides, fenilpropanoides e terpenoides (RANDAU et al., 2004). Os fitoquímicos do gênero *Croton* são muito diversos e os terpenoides são os metabólitos secundários mais encontrados no gênero. Os diterpenos são as substâncias mais comuns e incluem o clerodano, cembrano, traquilobano, halimanos, cauranos e labdanos. Os triterpenos pentacíclicos e esteroides, também são relatados frequentemente neste gênero. Outras classes de produtos naturais como alcaloides, flavonoides, saponinas e fenilbutanoides, também têm sido isoladas nesta espécie (CONSERVA et al., 2005). Alguns estudos fitoquímicos realizados com espécies de *Croton*, de ocorrência brasileira, têm proporcionado o isolamento de 109 compostos pertencentes as mais variadas classes estruturais, tais como, diterpenos (35,6%), alcaloides (24,8%) flavonoides (12,8%) e triterpenos (11%) (TORRES, 2008).

Estudos científicos têm demonstrado o potencial terapêutico de espécies de *Croton*, bem como de seus metabólitos secundários isolados. A taspina por exemplo, é uma substância isolada do gênero *Croton* com atividade citotóxica, obtida a partir da *Croton lechleri* (ITOKAWA et al., 1991). Estudos com o óleo essencial de *Croton flavens*, também demonstraram atividade antitumoral contra câncer de pulmão e adenocarcinoma de cólon, evidenciando como compostos majoritários o viridifloreno, germacrona, γ -bisaboleno e β -cariofileno (SYLVESTRE et al., 2005).

Recentemente, foram obtidas informações sobre o potencial biológico de *Croton argyrophyllus* contendo biciclogermacreno, β -pineno e espatulenol, no qual evidenciou-se potencial antioxidante e antimicrobiano de seu óleo essencial (BRITO et al., 2018). Estudos demonstraram também, a presença de *o*-glicosídeos, campeferol, quercetina, flavonoides C-glicosilados, taninos e derivados do ácido cinâmico na espécie *Croton cajucara* Benth, a qual demonstrou potente atividade anti-inflamatória (NASCIMENTO et al., 2017).

Inúmeros estudos têm demonstrado a capacidade antioxidante e potencial antitumoral em *Croton lechleri* Mull. Arg. (LOPES; LOPES et al., 2004; ALONSO-CASTRO et al., 2012), atividade antimicrobiana, em *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê) (ARRAIS et al., 2014), atividade antimalárica contra *Plasmodium berghei* em *Croton macrostachyus* (MOHAMMED; ERKO; GIDAY, 2014), atividade anti-isquêmica em *Croton membranaceus* (AFRIYIE et al., 2013) e propriedades antioxidantes de *Croton cajucara* Benth (RODRIGUES et al., 2012).

Outros estudos demonstraram a atividade gastroprotetora de *Croton rhamnifolioides* e *Croton cajucara* B. (NASCIMENTO et al., 2017; VIDAL et al., 2017), atividade anti-angiogênica em *Croton crassifolius* (HUANG et al., 2015), atividade antibacteriana de *Croton ceanothifolius* (DE ARAÚJO et al., 2020), atividade anti-hepatocarcinoma de *Croton crassifolius* (TIAN et al., 2017), efeito antiproliferativo de *Croton campestris* (ARAÚJO et al., 2017), efeito antileishmania de *Croton cajucara* B. contra *Leishmania amazonenses* (LIMA et al., 2015); efeito antitumoral de *Croton tiglium* (ZHANG et al., 2015); cardioprotetor *Croton macrostachyus* (AYZA; BALASUBRAMANIAN; BERHE, 2020) e efeito antiviral de *Croton mauritanus* contra a replicação do vírus da chikungunya (CORLAY et al., 2014).

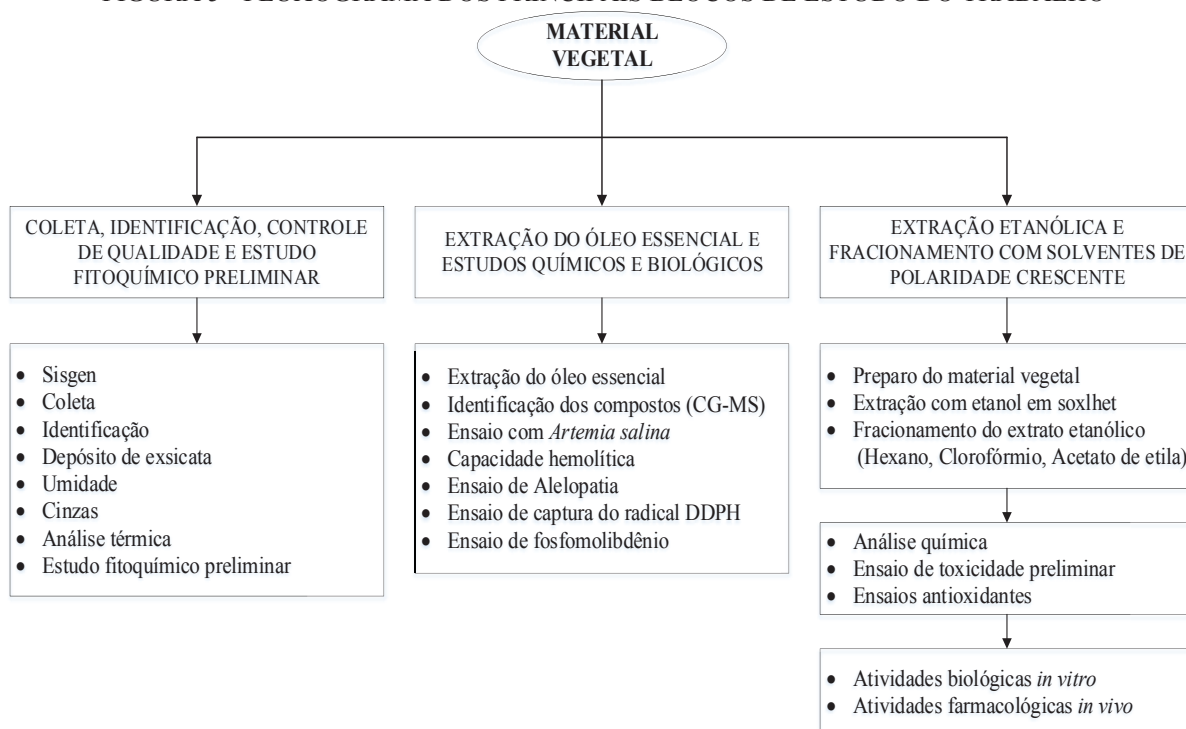
Estudos farmacológicos com a espécie *Croton urucurana* Baill, demonstraram atividades anti-inflamatória e antinociceptiva, o que pode estar relacionado com sua composição química, na qual estão presentes diterpenos, alcaloides e flavonoides (CORDEIRO et al., 2016). Em vista disso, o gênero *Croton* manifesta expressiva relevância econômica e medicinal, devido à presença de óleos essenciais e diversas substâncias ativas, como terpenoides, flavonoides e alcaloides (BRAGA, 1960; JONES 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. BLOCOS DE ESTUDOS

O estudo do material vegetal seco, incluiu o processo de identificação da espécie, depósito de exsicata, autorização de acesso ao patrimônio genético, coleta e secagem. Posteriormente foi avaliado o controle de qualidade da planta seca e realizado a extração do óleo essencial para estudo de sua composição química, propriedades biológicas e potencial antioxidante. Por fim, realizou-se a extração etanólica e o fracionamento do extrato em solventes de polaridade crescente. O extrato e frações foram utilizados em estudos bioguiados, no qual avaliou-se a composição química. Realizou-se o isolamento de substância bioativa, estudo do potencial toxicológico preliminar, da capacidade antioxidante, biológica e farmacológica (FIGURA 5).

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DOS PRINCIPAIS BLOCOS DE ESTUDO DO TRABALHO



FONTE: O autor (2020).

3.2 IDENTIFICAÇÃO, DEPÓSITO DE EXSICATA E COLETA DE *Croton glandulosus*

As partes aéreas de *Croton glandulosus* (FIGURA 6) foram encontradas no Campus da UEPG, Ponta Grossa – Paraná, 25,15327S, 50,13873W a 835 m de altitude, em meio à

braquiária, no interior da mata, próximos aos trilhos do trem. Foi realizada a coleta de um exemplar para identificação e produção da exsicata, que está depositada no Museu Botânico Municipal de Curitiba, sob o número de depósito *MBM 220416*. Posteriormente, realizou-se a coleta da planta, em fevereiro de 2016, durante o período de florescimento, para as extrações e desenvolvimento das análises.

FIGURA 6 - ESPÉCIE DE *Croton glandulosus* DURANTE O FLORESCIMENTO



FONTE: O autor (2020).

3.3 CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL SECO

3.3.1 Determinação do teor de umidade e de cinzas

O teor de umidade das folhas secas de *C. glandulosus*, foi avaliada por método gravimétrico, em quintuplicata, conforme descrito pela Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). Foi realizada a pesagem de 5 g de planta seca moída em cadinho de porcelana tarado, que foi para estufa a 105 °C por 5 horas. Os resultados foram apresentados em porcentagem de umidade em relação ao material vegetal seco. O teor de cinzas totais foi avaliado por incineração da amostra em mufla (600 °C), por 6 horas, utilizando-se os cadinhos de porcelana do ensaio anterior, com a amostra seca. O teste foi realizado em quintuplicata, conforme metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019), e os resultados expressos em porcentagem de cinzas totais, calculados em relação ao material vegetal seco.

3.3.2 Estudo termoanalítico

A análise térmica das partes aéreas de *C. glandulosus* foi realizada por termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG). Neste ensaio utilizou-se cadinhos de alumínio contendo 5 mg das partes aéreas secas. As curvas de TG/ DTG foram obtidas na faixa de temperatura de 20 a 700 °C, com razão de aquecimento de 15 °C.min⁻¹, utilizando-se termobalança modelo TGA 50 (Shimadzu), sob atmosfera dinâmica e fluxo de ar sintético (150 mL.min⁻¹). A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios, empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monohidratado, conforme norma da *The American Society for Testing and Materials* (ASTM, 1993).

3.4 ENSAIO SISTEMÁTICO DE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

O estudo qualitativo dos grupos fitoquímicos das partes aéreas de *Croton glandulosus* foi realizado conforme descrito por Moreira (1979) e adaptado por Miguel (2003).

3.4.1 Preparo do extrato aquoso a 20%

Para o preparo do extrato aquoso utilizou-se 40 g do material vegetal seco e 200 mL de água destilada levado à maceração em banho-maria (60 °C) por 2 horas, com agitação manual ocasional.

3.4.1.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

O extrato aquoso (5 mL) foi particionado em 3 tubos de ensaio. No primeiro adicionou-se ácido clorídrico 1 N até a atingir pH 1. No segundo, adicionou-se hidróxido de sódio 1% até atingir pH 10 e no terceiro, foi realizado o ajuste para neutralização do meio em pH 7. A reação foi considerada positiva em caso de formação da coloração avermelhada em meio ácido; azulada para o meio alcalino e violácea para meio neutro. Em caso de formação de coloração verde, a reação é considerada positiva para flavonoides.

3.4.1.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Os 3 tubos de ensaio utilizados no ensaio para heterosídeos antociânicos (item 4.4.1.2) foram agitados por 5 minutos e deixados em repouso por mais 30 minutos. A ocorrência de espuma com característica persistente, maior ou igual a um centímetro, indica a presença de heterosídeos saponínicos.

3.4.1.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Nesta análise, 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para um tubo de ensaio, seguido da adição de 1 mL de ácido sulfúrico 1N. Posteriormente, suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico no tubo e este foi levado ao banho-maria (60 °C) por 30 minutos. O aparecimento de cor vermelha na tira de papel indica a presença de heterosídeos cianogênicos.

3.4.1.4 Pesquisa de taninos

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de extrato aquoso, seguido de 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. O aparecimento de coloração azul é sugestiva da presença de taninos hidrolisáveis, a cor verde pode indicar taninos condensados e a cor marrom a presença de polifenóis.

3.4.1.5 Pesquisa de amino grupos

Neste teste, 10 mL de extrato aquoso foram levados à concentração em banho-maria (60 °C) em cápsula de porcelana. Posteriormente em uma tira de papel de filtro, foram adicionadas 5 gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem do papel filtro, este foi nebulizado com solução de ninhidrina e levado à estufa à temperatura (100 °C) por um período de 15 minutos. A reação é considerada positiva, caso ocorra o aparecimento de coloração azul-violeta.

3.4.1.6 Pesquisa de ácidos fixos

Neste ensaio, adicionou-se 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1N em um balão que foi deixado sob refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, a solução foi

acidificada com H_2SO_4 2N e extraídas 3 porções de 10 mL, com éter etílico. Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativo, filtrados e evaporados em banho-maria (50 °C) até a secura. O resíduo foi levado a estufa por 10 minutos e adicionado de 5 mL de NH_4OH 1N. O resíduo amoniacal foi impregnado em tira de papel filtro em 2 pontos principais. O papel foi seco em estufa e posteriormente o reativo de Nessler foi gotejado em um dos pontos. O aparecimento de cor marrom indica a presença de ácidos fixos.

3.4.1.7 Pesquisa de ácidos voláteis

Neste ensaio, 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para um tubo de ensaio e acidificados com H_2SO_4 1N. Uma fita indicadora de pH foi suspensa no tubo e este levado ao banho maria (60 °C) por 30 minutos. O aparecimento de valores de pH abaixo de 7 indicam a presença desses ácidos.

3.4.2 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

Para o preparo do extrato hidroalcoólico, 40 g das partes aéreas secas de *C. glandulosus* foram maceradas em 200 mL de álcool etílico a 70% (v/v), em banho-maria (70 °C) por 1 hora. A partir deste extrato realizou-se extrações consecutivas utilizando-se solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila). O processo de fracionamento foi realizado agitando-se o solvente em funil de separação, por 10 vezes com volumes de 20 mL. Ao final de cada extração, completou-se as porções extraídas resultantes para o volume de 200 mL com etanol.

3.4.2.1 Pesquisa de alcaloides

Neste ensaio foram utilizados 50 mL de cada fração, levados à secura em banho-maria a 70 °C. Após a concentração, o extrato e frações foram ressobilizados em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Posteriormente, as soluções obtidas foram transferidas para tubos de ensaio e avaliadas quanto a presença de alcaloides, adicionando-se os seguintes reativos: Reativo de Mayer (precipitado ou turvação branca), Reativo de Dragendorff (precipitado cor vermelho-tijolo), Reativo de Bouchardat (precipitado alaranjado).

3.4.2.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Neste teste, 10 mL do extrato hidroalcoólico e frações foram transferidos para uma cápsula de porcelana e levados à secura em banho-maria (60 °C). O resíduo foi ressolubilizado em 5 mL de álcool etílico P.A., seguido da adição de 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e levados à ebulição. A reação caracteriza-se como positiva pelo aparecimento de coloração vermelha.

3.4.2.3 Pesquisa de flavonoides

a) Heterosídeos flavônicos:

Neste teste 20 mL do extrato hidroalcoólico e frações foram levados à secura em banho-maria e ressolubilizados em 10 mL de etanol absoluto. As frações foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante. A reação foi considerada positiva para flavonas, em caso de formação da cor laranja. A formação da cor violeta indica a presença de flavanonas e a cor vermelha a presença de flavonóis.

b) Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock:

Em cápsula de porcelana, 10 mL de cada fração foram levados à secura em banho-maria (60 °C). Posteriormente, foram adicionados de 5 gotas de acetona (P.A), 30 mg de ácido bórico e ácido oxálico (1:1) e a cápsula foi levado a secura novamente. Por fim, adicionou-se 5 mL de éter etílico. A reação foi considerada positiva para flavonóis, quando observado sob lâmpada ultravioleta, o aparecimento de fluorescência amarela esverdeada.

c) Ensaio de Pacheco

Neste teste, 10 mL do extrato e frações foram levados à secura, adicionados de cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético. Em seguida foram adicionados 0,1 mL de HCl concentrado. A reação foi considerada positiva para dihidroflavonóis em caso de aparecimento da coloração roxa.

d) Ensaio com Zinco (Zn) em Ácido clorídrico (HCl)

Neste teste, 10 mL do extrato e frações foram levados à secura e ressolubilizados em 10 mL de etanol. Posteriormente, 5 mL da solução foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados de pastilhas de Zn seguido da adição de HCl fulmigante. A reação foi considerada positiva para dihidroflavonóis em caso de formação da coloração roxa violeta.

3.4.2.4 Pesquisa de cumarinas

Neste teste, 30 mL de cada extrato e frações, foram acidificadas com ácido clorídrico 2 N até atingir pH 1 e levados à banho-maria (60 °C), até a concentração de 5 mL. A fração hidroalcoólica foi transferida para um funil de separação, extraída duas vezes com 10 mL de éter etílico. Já a fração etérea resultante, foi levado diretamente à secura até a concentração de 5 mL. Os volumes obtidos foram transferidos para tubos de ensaio no volume e adicionados de 2 mL de hidróxido de sódio 1 N. Sob lâmpada ultravioleta (366 nm por 15 min) a formação de fluorescência de coloração azul ou verde-amarelada, torna a reação positiva para cumarinas. O extrato residual foi aplicado em papel filtro sob três pontos. A mancha 1 (coberta com papel alumínio) e mancha 2 (não coberta) foram tratadas com NaOH 1N. O papel filtro foi posto sob luz ultravioleta e a formação de fluorescência de cor azul ou verde-amarelada na mancha 2, também torna a reação positiva.

3.4.2.5 Pesquisa substâncias iridoidais

Foram transferidos 2 mL do extrato e frações, para três tubos de ensaio. No primeiro foram adicionados cristais de floroglucinol e 1 mL de HCl. A reação é considerada positiva em caso do aparecimento de coloração verde escura. No segundo tubo, foram adicionadas duas gotas de ácido sulfúrico e o aparecimento da coloração rosa violácea torna a reação positiva. No terceiro tubo, foram adicionados cristais de vanilina e duas gotas de ácido sulfúrico, em caso de reação positiva observa-se o aparecimento de coloração rosa cereja.

3.4.2.6 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Neste teste, 30 mL do extrato e frações foram transferidos para balões, adicionados de 5 mL de ácido sulfúrico a 10 % e deixados sob refluxo por 30 minutos. O volume final foi filtrado, adicionado de 30 mL de água destilada e a fração orgânica das frações foi extraída. O extrato hidroalcoólico foi extraído 2 vezes com 10 mL de éter etílico. Os extratos resultantes foram concentrados em banho-maria (60 °C) até o volume de 5 mL e submetidos à da reação de Bornträger, a qual adiciona-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio. O aparecimento da cor vermelha indica a reação positiva para naftoquinonas e/ou antraquinonas.

3.4.2.7 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos

a) Reação de Liebermann-Bouchard:

Neste teste, 30 mL do extrato e frações foram levados à secura em banho-maria (60 °C) e ressolubilizados em 5 mL de clorofórmio, seguido de filtração. Os extratos obtidos foram transferidos para tubos de ensaio em diferentes volumes (0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL) completando-se para 2 mL com clorofórmio. Posteriormente, realizou-se a reação de Liebermann-Bouchard, adicionando-se 1 mL de anidrido acético e 2 mL de H₂SO₄ concentrado, na qual a formação de cor rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. A formação de coloração verde indica a presença da função carbonila na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6, e a formação da cor amarela, indica a existência de uma metila no carbono 14.

b) Reação de Keller Kiliani:

Neste teste, 2 mL do extrato e frações foram levados à secura em banho-maria (60 °C), adicionados de 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de cloreto férrico a 1%. Posteriormente, realizou-se a transferência para um tubo de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A obtenção de cor na zona de contato dos sistemas líquidos e/ou coloração na fase acética, sugere a presença de desoxi açúcares, sendo azul indicativo de esteroides e verde para triterpenos.

3.5 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. glandulosus*: ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

3.5.1 Extração do óleo essencial de *C. glandulosus*

As partes aéreas de *C. glandulosus*, secas em temperatura ambiente, foram submetidas à extração do óleo essencial, por meio da técnica de hidrodestilação em Clevenger por um período de 6 seis horas, conforme descrito pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019). O balão acoplado ao aparelho de Clevenger foi mantido sobre uma manta térmica a 95 °C, aproximadamente e o rendimento do óleo calculado pela fórmula (1):

$$\text{Rendimento óleo \%} = \frac{\text{Quantidade de óleo extraído (mL)} \times 100}{\text{Quantidade de material utilizado (g)}} \quad (1)$$

3.5.2 Caracterização química do óleo essencial de *C. glandulosus*

A elucidação da composição química do óleo essencial das partes aéreas de *C. glandulosus* foi realizada por cromatografia gasosa (CG), cujo sistema empregado foi acoplado a um espectrômetro de massa (Shimadzu® CG-EM – QP 2010 Plus equipado com coluna capilar Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo splitless a 250 °C, interface e fonte de íons a 201 °C. A voltagem de ionização foi ajustada em 70v e a faixa de varredura de massas analisada foi entre m/z 40 e m/z 380, utilizando-se Hélio (He) como gás de arraste. Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor iniciou-se em 60 °C e foi aumentada em uma taxa de 3 °C por minuto, até atingir 250 °C. A pressão interna da coluna foi de 20 psi. Para a identificação dos compostos químicos do óleo essencial, os dados obtidos no cromatograma, foram comparados com a biblioteca de espectros de massa da NIST-14 e identificados utilizando-se o Índice de Kovats também. Considerou-se identificados apenas os compostos que corresponderam nas duas análises (ADAMS, 2007).

3.5.3 Ensaio de toxicidade preliminar do óleo essencial

3.5.3.1 Ensaio de toxicidade em *Artemia salina*

Este ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), com modificações. Os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir por 48 horas, em solução salina (pH 9, 30 g L⁻¹ de sal marinho Blue Treasure®), sob aeração contínua, luz artificial e temperatura controlada entre 27 °C e 30 °C. Após a eclosão dos ovos, 10 náuplios de *Artemia salina* foram transferidas para tubos de ensaio pequenos, contendo 5 mL das diluições das amostras de óleo essencial (0,05% de polissorbato 80 em solução salina), nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µL/mL (v/v). Como controle positivo utilizou-se sulfato de quinidina, nas mesmas concentrações que a amostra. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente (27±2 °C), por um período de 24 horas e posteriormente realizada a contagem dos náuplios sobreviventes. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se o método Probitos no programa SPSS versão 6.0 (SPSS, 1993), o qual forneceu os valores de CL₅₀ com 95% de confiabilidade. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

3.5.3.2 Avaliação da capacidade hemolítica em eritrócitos de carneiro

A capacidade hemolítica foi realizada conforme metodologia descrita por Aslam et al. (2012). Para preparo da solução de hemácias utilizou-se sangue de carneiro desfibrilado (Newprov®) como fonte de obtenção dos eritrócitos. O sangue homogeneizado foi lavado 3 vezes com PBS pH 7,4 (NaCl 58,44 g/mol, KCl 74,5513 g/mol, Na₂HPO₄ 141,96 g/mol, KH₂PO₄ 136,086 g/mol, água qsp.) a 4 °C, centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos e o sedimento eritrocitário ressuspensionado até a concentração de 2,5% em PBS. A solução estoque (SE) das amostras e controles foi preparada na concentração de 1mg/mL, solubilizadas em solução de PBS contendo 10% de metanol. As diluições foram realizadas a partir das SEs, diluindo-as em PBS, para obtenção das seguintes concentrações: 75, 100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL. Como controle positivo utilizou-se Triton 0,1% e como controle negativo, soluções de PBS e metanol 10%. Para fins de comparação dos resultados, utilizou-se saponina como padrão hemolítico, nas mesmas concentrações que as amostras.

Em microtubos de centrifugação (Eppendorf®), adicionou-se 20 µL da amostra ou controles e 180 µL da solução de hemácia (2,5%), incubando-os em estufa a 37±0,5 °C por 30 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas ao banho de gelo por 5 minutos e centrifugadas a 3000 rpm (5 minutos). Retirou-se 100 µL do sobrenadante hemolisado e diluiu-se em 900 µL de PBS. Posteriormente, transferiu-se 200 µL da diluição para microplacas de 96 poços para leitura das absorbâncias a 576 nm (Espectrofotômetro Multiskan FC, Thermo Scientific®). O teste foi realizado em quintuplicata, os resultados expressos em % hemólise e calculados conforme a fórmula (2) (RASOOL et al, 2015). Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey p<0,05, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Absorbância da amostra (ou padrão)} - \text{branco}}{\text{Absorbância do triton} - \text{branco}} \times 100 \quad (2)$$

3.5.3.3 Avaliação da capacidade alelopática em *Lactuca sativa*

Neste ensaio utilizou-se sementes de alface (*Lactuca sativa*), variedade Babá de verão (Topseed®). As amostras foram solubilizadas em polissorbato 80 na proporção 1:1 (m/m), nas concentrações de 1% 0,1% 0,01% 0,001% de óleo essencial (FUJIWARA et al., 2017). O teste foi realizado conforme descrito por Silva et al. (2014), em caixas gerboxes,

contendo papel filtro (Whatman® n°6) em cada caixa. Dois papeis foram acondicionados no fundo da caixa, umedecidos com 6 mL de água destilada e um papel filtro foi colado à tampa, onde foi inserido as amostras. Cada caixa gerbox foi dividida em 4 quadrantes, representando as replicatas, contendo 5 sementes cada. As gerbox foram levadas à BOD (*Biochemical oxygen demand*) por um período de 7 dias (25±0,5 °C).

Diariamente as sementes germinadas foram contadas para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG) (fórmula 3), conforme descrito por Maguire (1962). As sementes foram consideradas germinadas, após o aparecimento da protusão da radícula através do tegumento (DE FEO et al., 2002; ADEGAS et al., 2003).

$$\frac{n^{\circ} \text{ Sementes germinadas}}{\text{Dia 1}} + \frac{n^{\circ} \text{ Sementes germinadas}}{\text{Dia 2}} + \frac{n^{\circ} \text{ Sementes germinadas}}{\text{Dia 3}} + \dots + \frac{n^{\circ} \text{ Sementes germinadas}}{\text{Dia 7}} \rightarrow \text{Soma total} = \text{IVG} \quad (3)$$

No último dia, foi avaliado o crescimento do hipocótilo e radícula das plântulas, medindo-se o comprimento em mm destas, com auxílio de um paquímetro. Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.5.4 Capacidade antioxidante total do óleo essencial de *C. glandulosus*

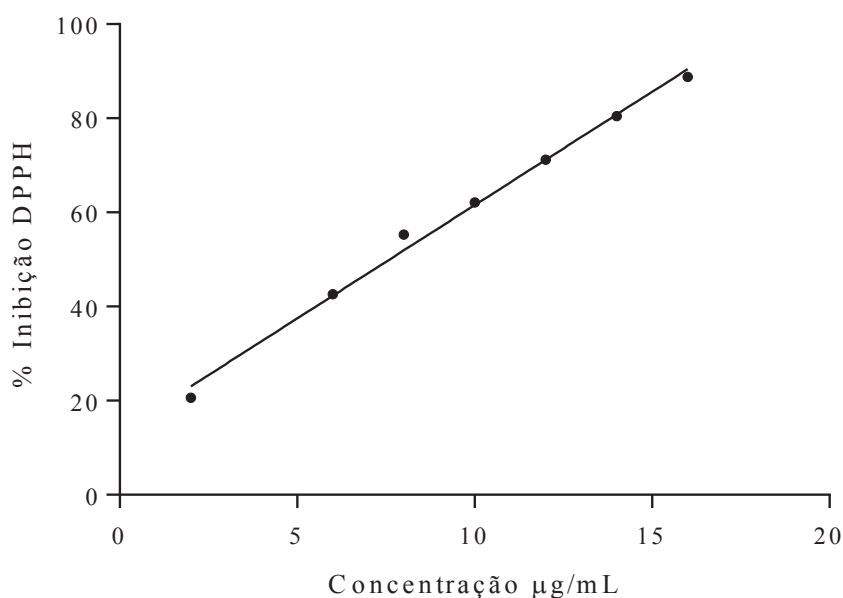
3.5.4.1 Avaliação da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH

O potencial sequestrante do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) do óleo essencial das partes aéreas de *C. glandulosus* foi determinado por meio de metodologia adaptada (MENSOR et al., 2001; SANTOS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2011; SALGUEIRO et al., 2014) em diferentes concentrações (100, 250, 500, 750 e 1000 µL/mL). Para fins de comparação entre o extrato e frações, utilizou-se o padrão Rutina (Merck®) nas concentrações de 2, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 µg/mL). No ensaio foram adicionados 142 µL da amostra e 58 µL da solução de DPPH (0,3mM) em microplacas de 96 poços (a quantidade de amostra e reagente foi calculado para atingir o volume final de 200 µL na microplaca). Como branco utilizou-se a amostra e metanol no lugar do DPPH. Como controle negativo, metanol no lugar da amostra e DPPH. Após 30 minutos de incubação as absorbâncias foram lidas a 518 nm em espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific®). Os dados foram calculados em porcentagem de inibição conforme a fórmula (4).

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Absorbância da amostra} - \text{branco}}{\text{Absorbância do controle negativo} - \text{branco}} \times 100 \quad (4)$$

E os resultados expressos como concentração efetiva para 50% (CE₅₀) de capacidade antioxidante, foram obtidos a partir de cálculo utilizando-se a equação da reta da curva analítica das amostras (FIGURA 7). Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

FIGURA 7 - CURVA ANALÍTICA E EQUAÇÃO DA RETA DA RUTINA, NO ENSAIO DE DPPH



FONTE: O Autor (2020).

3.5.4.2 Avaliação da capacidade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio.

A atividade antioxidante por meio do método da redução do complexo fosfomolibdênio foi realizada conforme metodologia descrita por Prieto et al. (1999). As soluções estoque (SEs) do óleo essencial, controles positivos rotina, ácido ascórbico e BHT, foram preparadas na concentração de 200 µL/mL (em metanol). Em tubos de ensaio, alíquotas de 0,3 mL das diluições das amostras foram adicionadas a 3 mL do reativo de fosfomolibdênio (fosfato de sódio tribásico 0,1 M (28 mL), solução de molibdato de amônio tetraidratado 0,03 M (12 mL), ácido sulfúrico 3 M (20 mL) e água destilada qsp. 100 mL). Os tubos foram fechados, levados ao banho à 95°C por 90 minutos e deixados esfriar em

temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram transferidas para microplacas de 96 poços e a leitura das absorbâncias realizadas a 695 nm (Espectrofotômetro Multiskan FC, Thermo Scientific®). A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%) ao controle positivo rutina, ácido ascórbico e BHT, utilizando-se a fórmula (5):

$$AAR\% = \frac{\text{Absorbância da amostra} - \text{branco}}{\text{absorbância do controle positivo} - \text{branco}} \times 100 \quad (5)$$

Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.6 ESTUDOS QUÍMICOS DO EXTRATO E FRAÇÕES *C. glandulosus*

3.6.1 Preparo do material vegetal e obtenção do extrato bruto etanólico

As partes aéreas da planta (talos e folhas) foram deixadas a secar em temperatura ambiente e posteriormente reduzidas a partículas menores por meio de moagem em moinho de facas e martelo. Para obtenção do extrato etanólico bruto, 1.981,2 g de partes aéreas secas de *C. glandulosus* foram submetidas à extração em Soxhlet modificado (número de registro PI 0601703-7) utilizando-se 8 litros de álcool etílico absoluto P.A, por 48 horas. O extrato obtido foi filtrado, separado uma parte para ensaios de atividades biológicas e outra parte concentrada em evaporador rotatório (150 rpm/ 45 °C). O extrato resultante foi utilizado para o fracionamento com solventes de polaridade crescente.

3.6.2 Fracionamento do extrato etanólico de *C. glandulosus*

A partir do extrato etanólico bruto (EBR), realizou-se o fracionamento com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila), por meio de partição líquido-líquido em aparelho de Soxhlet modificado (FIGURA 8), sob refluxo contínuo. Ao final do processo, todas as frações foram levadas à secagem em banho-maria (50±5 °C), para remoção total dos solventes. O fracionamento do extrato etanólico resultou nas frações hexânica (HEX), clorofórmica (CLO), acetato de etila (FAC) e fração residual (RES). Após este

processo, procedeu-se o estudo de composição química, isolamento e identificação de substâncias. Em seguida, realizou-se a avaliação do potencial toxicológico preliminar e capacidade antioxidante, para direcionamento dos estudos *in vivo* (FIGURA 8).



FONTE: O autor (2020).

3.6.3 Pesquisa de grupos químicos por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) do extrato e frações de *C. glandulosus*

Realizou-se a pesquisa de grupos químicos (esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos, alcaloides e cumarinas) do extrato etanólico (EBR) e frações HEX, CLO, FAC e RES. Para a CCD utilizou-se como fase fixa placas com sílica gel (Merck® 60 F254), cortadas no tamanho de 2,5x5 mm. As fases móveis e os reveladores estão descritas no QUADRO 2.

QUADRO 2 - ANÁLISE DE GRUPOS QUÍMICOS POR CCD

Grupo químico	Fase Móvel	Revelador	Resultado esperado	Metodologia
Esteroides e Triterpenos	Tolueno:acetato de etila (93:7)	Vanilina Sulfúrica (1%)	Presença de banda azul-violácea e/ou verde (a olho nu) Presença de banda marrom escura (polifenóis)	Wagner, 1996
Flavonoides e Taninos	Acetato de etila:ácido fórmico:água destilada (95:3:2)	Reativo de NEU (Flavonoide)	Presença de banda verde e/ou amarela e/ou laranja fluorescente e/ou castanha (sob luz UV – 254 nm)	Wagner, 1996
		Cloreto férrico (Taninos e Polifenóis)	Presença de banda azul (taninos hidrolisados) e/ou verde escura (taninos condensados) Presença de banda castanha escura a preta (polifenóis, a olho nu)	
Alcaloides	Clorofórmio:metanol (95:5) c/ universo amônio	Dragendorff	Presença de banda de coloração tijolo (a olho nu)	Valente <i>et.al</i> , 2006
Cumarinas	Tolueno:acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU e Hidróxido de sódio 1N	Presença de banda azul fluorescente sob luz UV (254 nm) que se intensifica com a adição de Hidróxido de sódio	Miguel, 2003

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Reativo de NEU: difenilboriloxietilamina 1% em metanol seguido de polietilenoglicol 4000 5% em etanol.

3.6.4 Isolamento e identificação de substâncias puras da fração acetato de etila de *C. glandulosus*

3.6.4.1 Isolamento de substâncias químicas da fração acetato de etila de *C. glandulosus*

Para isolamento de compostos químicos a partir da fração acetato de etila, utilizou-se uma coluna cromatográfica gravimétrica e sílica em gel (60 Merck 0,063 – 0,200 mm) como fase estacionária. Como fase móvel, utilizou-se gradiente de concentração contendo acetato de etila e hexano na proporção de 70:30 até 95:5, seguido da fase acetato de etila e metanol, variando as concentrações entre 95:5 à 15:85.

3.6.4.2 Identificação das substâncias puras isoladas da fração acetato de etila de *C. glandulosus*

Para identificação das substâncias isoladas, utilizou-se o espectrômetro de RMN Bruker® modelo DPX 200 MHz, observando-se os núcleos de ^1H e ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em DMSO- d_6 (dimetilsulfóxido deuterado) contendo 0.03 % TMS (Tetrametilsilano) que foi utilizado para referenciar o espectro. A determinação da estrutura

das substâncias foi realizada com base na comparação de dados espectroscópicos de deslocamento do ^1H e do ^{13}C encontrados na literatura.

3.6.5 Quantificação da vitexina e Fingerprint do extrato e frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta (CLAE-UV).

A obtenção do fingerprint do extrato e frações foi realizada de acordo com o método descrito por Paula (2014), empregando-se o equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV) com detector de Ultravioleta (Varian® modelo ProStar). Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (Waters 4,6x150 mm) e 2 fases móveis: metanol grau CLAE (Fase A) e ácido fosfórico aquoso a 1% (Fase B). O extrato EBR e frações CLO, FAC e RES, foram preparados na concentração de 1mg/mL em metanol grau CLAE.

Para eluição das amostras, o volume injetado foi de 20 μL (25 °C) com vazão de fluxo da bomba de 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e detecção por varredura de espectro de 200 nm a 400 nm. Realizou-se um gradiente de concentração iniciando-se com 5% de fase A e 95% da fase B (constante de 0 a 5 min). A partir dos 5 min até 35 min aumentou-se a porcentagem de fase A e reduziu-se a porcentagem de fase B. Aos 35 minutos a condição experimental foi alterada e estabelecida em 95% (Fase A) e 5% (Fase B), com manutenção dessas concentrações até os 40 minutos de análise. Para a quantificação da vitexina no extrato EBR e frações CLO, FAC e RES, realizou-se a construção de uma curva de calibração construída com injeções de 5 concentrações, em triplicata (12,5 $\mu\text{g/mL}$ a 50 $\mu\text{g/mL}$) do padrão de Vitexina (Aldrich 99% de pureza). Os resultados foram expressos em μg de vitexina por mg de extrato ou fração ($\mu\text{g/mg}$).

3.7 ESTUDOS BIOLÓGICOS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*

3.7.1 Avaliação da letalidade de *Artemia salina* do extrato e frações

Este ensaio foi realizado conforme item 3.5.3.1, seguindo a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), com modificações. A solução estoque (SE) do extrato e frações, foi preparada na concentração de 1 mg/mL solubilizadas em solução salina com 1% de DMSO. As amostras foram testadas em 7 concentrações diferentes (10, 50; 100, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), diluídas a partir da SE. Como controle negativo utilizou-se uma solução de DMSO 1% em solução salina e como controle positivo sulfato de quinidina, nas mesmas

concentrações que a amostra. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se o método Probitos no programa SPSS versão 6.0 (SPSS, 1993), o qual forneceu os valores de CL_{50} com 95% de confiabilidade. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

3.7.2 Avaliação da capacidade hemolítica do extrato e frações

A atividade hemolítica foi realizada conforme item 3.5.3.2 seguindo a metodologia descrita por Aslam et al. (2012) e descrita anteriormente no ensaio de óleo essencial. Utilizou-se sangue de carneiro desfibrilado (Newprov[®]) como fonte de obtenção dos eritrócitos na concentração de 2,5% em PBS. Para o extrato, frações e padrões, realizou-se uma solução estoque (SE) preparada na concentração de 1mg/mL em PBS e 10% de metanol. Posteriormente, realizou-se diluições das amostras em PBS nas concentrações de 100, 250, 500, 750, 1000 μ g/mL.

Como controle positivo (100% de hemólise) utilizou-se Triton 0,1% (solubilizado em água destilada) e como controle negativo, soluções de PBS e metanol 10% (diluído em PBS). Para fins de comparação dos resultados, utilizou-se saponina como padrão hemolítico e Rutina (Merck[®]) como padrão anti-hemolítico, nas mesmas concentrações que a amostra. O teste foi realizado em quintuplicata e os resultados foram expressos em % hemólise (RASOOL et al., 2015). Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.7.3 Avaliação da capacidade alelopática em *Lactuca sativa* dos extratos e frações

Neste ensaio utilizou-se sementes de *Lactuca sativa* (Dicotiledônea), popularmente conhecida como alface, da variedade Babá de verão (Topseed[®]). O ensaio foi realizado conforme descrito por MACIAS et al. (2000), CHON et al. (2005) e DIAS et al. (2005), com modificações. O teste foi realizado em caixas gerboxes, contendo 2 papéis filtro (Whatman[®] n°6) acomodados no fundo de cada caixa. Extrato e frações, foram solubilizados em metanol nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 μ g/mL. Adicionou-se 6 mL das amostras nas caixas contendo o papel filtro, e estas foram deixadas sob fluxo laminar para evaporação do solvente, por um período de 24 horas.

Como controle negativo, utilizou-se água destilada e metanol (que foi evaporado), nas mesmas condições que as amostras. Para cada amostra, foram utilizadas duas gerboxes,

uma para avaliação do crescimento e outra para avaliação da germinação. Cada gerbox foi dividida em 4 quadrantes, representando a quadruplicata, contendo 5 sementes em cada conforme demonstrado na FIGURA 9.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Esquemática de gerbox dividida em 4 quadrantes, contendo 5 sementes cada exemplificadas em círculos amarelos.

Após a secagem, os extratos foram ressuspensos com a adição de 6 mL de água destilada. Posteriormente, adicionou-se as sementes e as gerboxes foram levadas à BOD (*Biochemical oxygen demand*) por um período de 7 dias ($25 \pm 0,5$ °C). Durante este período, diariamente as sementes foram avaliadas quanto à sua germinação para cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), conforme descrito por Maguire (1962) e demonstrado no item 3.5.3.3. As sementes foram consideradas germinadas, após o aparecimento da protusão da radícula através do tegumento (DE FEO et al., 2002; ADEGAS et al., 2003). No último dia, foi avaliado o comprimento (mm) do hipocótilo e radícula das plântulas de alface, com auxílio de um paquímetro. Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.7.4 Avaliação da capacidade larvicida em *Aedes aegypti* do extrato hexânico

No teste de capacidade larvicida, utilizou-se a linhagem “Rockfeller” de *Aedes aegypti* Linneaus 1762 (Diptera: Culicidae), cedido pelo Instituto Oswaldo Cruz (Estado do Rio de Janeiro, Brasil) da coleção original no CDC (Centro de Controle de Doenças, Porto Rico, EUA), conforme metodologia descrita pela WHO (2009) e por Grzybowski, et al. (2012). As colônias do mosquito foram mantidas no Laboratório de Medicina e Entomologia

Veterinária do Departamento de Zoologia da UFPR, a 25 °C e 80% de umidade relativa. O teste foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal do setor de Ciências biológicas, sob o número 719 (ANEXO 1).

As fêmeas adultas dos mosquitos foram alimentadas com sangue de ratos Wistar para estimular a oviposição de ovos; que foram depositados em papel de filtro previamente colocado em recipiente plástico contendo água mineral (Ouro fino®). Os ovos coletados, foram novamente colocados em bandeja com água mineral (descolorada) e ração para peixe triturada (Tetramin®). A bandeja foi incubada a $28 \pm 0,2$ °C com fotoperíodo de 12 h, em estufa BOD (*Biochemical oxygen demand*) para a eclosão do 1º instar de larvas e permaneceram sob estas condições até sua evolução para o terceiro instar.

No bioensaio, foi utilizado o extrato hexano, devido aos resultados encontrados no teste de capacidade hemolítica. O teste larvicida com *A. aegypti*, foi realizado em quadruplicata, em 6 concentrações diferentes da amostra (50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL) solubilizadas em água mineral e 5% de metanol. O número de larvas por repetição foi de $n = 15$, sendo que no experimento foi utilizado um total de 60 larvas.

Para cada repetição, as larvas foram acondicionadas em recipientes plásticos de 300 mL, contendo 200 mL de solução da amostra. Utilizou-se como controle negativo, o grupo de larvas expostas apenas à água mineral e como controle do solvente, o grupo contendo a solução aquosa com 5% de metanol. Posteriormente, os recipientes com as larvas foram mantidos em BOD (26 °C) com fotoperíodo de 12 horas, por 24 horas. Após esse período foi realizada a contagem das larvas vivas e mortas para a determinação dos valores de CL_{50} e intervalos de confiança (95%), por meio do método de probitos no programa SPSS versão 6.0 (SPSS, 1993).

3.7.5 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e frações

Para o ensaio antimicrobiano por Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou em inglês MIC (*minimum inhibitory concentration*), utilizou-se cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25913), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) e cepas do fungo *Candida albicans* (ATCC 14053).

3.7.5.1 Avaliação da atividade antibacteriana do extrato e frações

Para obtenção dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizou-se o ensaio de microdiluição em caldo (CLSI, 2008a). Os extratos e frações foram preparados por meio da diluição seriada em 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha) em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em forma de “U”, em um intervalo de concentração de 100; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg/mL. As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao padrão de McFarland 0,5. Posteriormente 5 µL da suspensão bacteriana foram inoculadas nos orifícios da placa, para obtenção da concentração final de 10^4 UFC/mL.

Como controle negativo, utilizou-se a atividade inibitória dos diluentes etanol e DMSO, no qual adicionou-se 100 µL de solução de etanol 10% e DMSO 2% em 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos.

Para o controle de esterilidade, utilizou-se 100 µL de MHB e 100 µL do extrato e frações. A viabilidade bacteriana (controle positivo), foi preparada com 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica (35 °C) por um período de 20 horas. Posteriormente, adicionou-se 20 µL de solução aquosa de TTC (Cloreto Trifenil Tetrazolio – Merck, Darmstadt, Germany) a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por 3 horas (35 °C). Em seguida realizou-se a leitura visual dos resultados, no qual o aparecimento da coloração vermelha nos poços, é indicativo da ausência da atividade antimicrobiana, para a substância testada.

3.7.5.2 Atividade antifúngica do extrato e frações

Em microplacas de 96 poços com fundo em “U”, foram preparadas diluições seriadas dos extratos e frações, em meio líquido RPMI 1640 (Instituto Roswell Park Memorial - Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), em um intervalo de concentração de 100; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg/mL (CLSI, 2008b). As diferentes suspensões fúngicas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração inicial de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Estas foram diluídas em meio líquido para uma concentração final de $1,0$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL. Posteriormente, inoculou-se 100 µL deste preparado, nos orifícios das microplacas, que foram incubadas (35 °C) por um período de 48 horas. Após este período, adicionou-se 20 µL de TTC 0,5% e as placas foram novamente incubadas por 3 horas (35 °C). Em seguida

realizou-se a leitura visual dos resultados, no qual o aparecimento da coloração vermelha, é indicativo da ausência da atividade antimicrobiana.

3.7.5.3 Interpretação dos resultados

Resultados com ausência de atividade microbiana até a concentração de 100 µg/mL, é indicativo de bom potencial inibitório. Ausência de atividade microbiana entre 100-500 µg/mL, é indicativo de atividade inibitória moderada. Ausência de atividade microbiana entre 500-1000 µg/mL, é indicativo de atividade inibitória fraca. Acima de 1000 µg/mL a amostra é considerada com ausência de atividade inibitória (AYRES et al., 2008; SOUZA et al., 2014).

3.8 ESTUDOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *C. glandulosus*

3.8.1 Capacidade de captura do Radical DPPH do extrato e frações

Para avaliação do potencial antioxidante por DPPH, foi utilizada a técnica adaptada de MENSOR et al. (2001), SANTOS et al. (2007), NASCIMENTO et al. (2011) e SALGUEIRO et al. (2014), conforme descrito no item 3.5.4.1. A solução de DPPH na concentração de 0,03 mM foi preparada minutos antes de sua utilização. As soluções estoque (SE) do extrato e frações foram preparadas em uma concentração de 1mg/mL e solubilizados em metanol. A partir da SE foram preparadas diluições em metanol em 7 concentrações, variando de 2 µg/mL a 500 µg/mL. Para fins de comparação entre os extratos, utilizou-se Rutina (Merck®) cuja curva foi construída nas seguintes concentrações; 2, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 µg/mL.

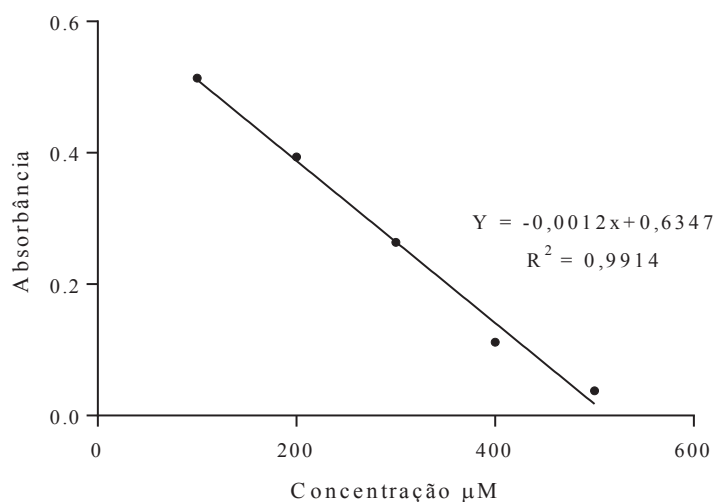
Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 142 µL da amostra e 58 µL da solução de DPPH (0,3mM), sob abrigo da luz. Como branco utilizou-se a amostra e metanol no lugar do DPPH. Como controle negativo, metanol no lugar da amostra e DPPH. Posteriormente, as microplacas foram incubadas por 30 minutos e as absorbâncias obtidas a 518 nm em espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific®). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição. A concentração efetiva para 50% de capacidade antioxidante (CE₅₀) foi obtida a partir de cálculo utilizando-se a equação da reta obtida pela confecção da curva analítica das amostras. Para a verificação das diferenças entre as médias

foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.8.2 Captura do cátion radical ABTS do extrato e frações

O potencial antioxidante pelo método de captura do ABTS•+ [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] foi realizado conforme a metodologia descrita por Re et al. (1999), modificado por Payet et al., (2005). Extrato e frações foram testados em 7 concentrações diferentes variando de 250 - 500 $\mu\text{g/mL}$ (solubilizadas em metanol), para confecção de curva analítica e obtenção da equação da reta. A solução de ABTS•+ foi previamente preparada com persulfato de potássio 140 mM e ABTS 7 mM e deixada reagir por 16 horas. Em microplacas de 96 poços, adicionou-se 280 μL de solução de ABTS•+ e 20 μL de amostra, sob abrigo de luz. Incubou-se as placas por 5 minutos a 30 °C e a leitura das absorbâncias foi realizada a 734 nm em espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific®). Para fins de comparação entre o extrato e frações, utilizou-se o padrão Rutina (Merck®) concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 55 $\mu\text{g/mL}$. A curva padrão de trolox foi obtida a partir de uma solução de 2 mM, diluída nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 μM (FIGURA 10). Os cálculos de capacidade antioxidante do extrato e frações equivalentes em trolox, foram calculados conforme metodologia descrita por Nenadis et al. (2004) e Rufino et al. (2007). A partir das absorbâncias obtidas das diferentes concentrações de trolox, determinou-se a equação da reta da curva padrão, conforme FIGURA 10.

FIGURA 10 - CURVA PADRÃO E EQUAÇÃO DA RETA DO TROLOX



FONTE: O autor (2020).

Posteriormente, calculou-se a absorbância referente a 1.000 µmol de trolox (fórmula 6) substituindo-se o valor de 1000 na equação da reta da curva padrão de trolox.

$$y = -ax + b, \text{ substituindo "x" temos: } y = -a(1000) + b \quad (6)$$

onde:

$x = 1.000 \text{ µmol do trolox}$

$y = \text{Absorbância correspondente a } 1.000 \text{ µmol de trolox}$

Em seguida, determinou-se a equação da reta de cada curva padrão do extrato e frações e substituiu-se nesta equação o valor de y (absorbância correspondente a 1.000 µmol de trolox) encontrado na fórmula 6. O valor obtido para o termo x foi correspondente à concentração do extrato ou frações (µg/mL) equivalente a 1.000 µmol de trolox (fórmula 7).

$$y = -ax + b \quad (7)$$

onde:

$y = \text{Absorbância encontrada para } 1.000 \text{ µmol de trolox}$

$x = \text{Concentração da amostra (µg/mL) equivalente a } 1.000 \text{ µmol de trolox}$

A concentração da amostra (µg/mL) encontrada em x foi dividida por 1.000 para obtenção do valor em g (gramas) conforme fórmula (8).

$$Xg \text{ (gramas)} = \frac{x}{1.000} \quad (8)$$

onde:

$x = \text{Concentração da amostra em µg/mL encontrada para } 1.000 \text{ µmol de trolox}$

$Xg = \text{Concentração da amostra em g (gramas) para } 1.000 \text{ µmol de trolox}$

O resultado final foi obtido pela divisão de 1.000 pelo valor de Xg encontrado na equação anterior, multiplicado por 1 (grama) para obtenção do resultado em µmol de Trolox por g de amostra (fórmula 9).

$$\mu\text{mol trolox por g} \frac{1.000}{X_g} \times 1 \quad (9)$$

onde:

X_g = Concentração da amostra em g encontrada para 1.000 μmol de trolox

$\mu\text{mol trolox por g}$ = Capacidade antioxidante encontrada em μmol equivalentes de trolox por g de amostra.

Os resultados foram expressos em μmol equivalentes de trolox por g de amostra ($\mu\text{mol.eq. Trolox.g}^{-1}$). Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

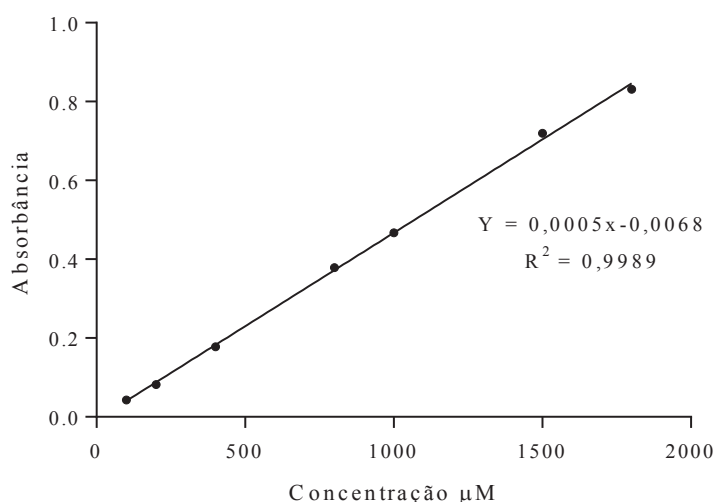
3.8.3 Poder de Redução do Ferro (FRAP) do extrato e frações

O ensaio de FRAP foi realizado seguindo as metodologias estabelecidas por Benzie, Strain, 1999; modificada por Pulido, Bravo, Saura-Calixto (2000), sendo adaptado para microplacas de 96 poços. Esta técnica se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) a Fe^{2+} -TPTZ (ferroso-tripiridiltriazina), de intensa cor azul e absorção máxima a 595 nm. O teste de FRAP foi realizado para o extrato e frações, utilizando-se 7 concentrações diferentes, variando de 80 - 600 $\mu\text{g/mL}$ (solubilizadas em metanol) para confecção de curva analítica e obtenção da equação da reta. Para fins de comparação entre o extrato e frações, utilizou-se o padrão Rutina (Merck®) nas concentrações de 10, 30, 40, 50, 60 e 90 $\mu\text{g/mL}$.

Resumidamente, adicionou-se em microtubos de 1,2 mL (tipo eppendorfs®), 900 μL de reagente FRAP (25 mL de tampão acetato 300 mM, pH 3,6; 2,5 mL de solução TPTZ ([2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina]) 10 mM em 40 mM HCl e 2,5 mL de FeCl_3 20 mM em solução aquosa), 90 μL de água destilada e 30 μL de amostra. Transferiu-se 200 μL da mistura reacional para microplacas de 96 poços e incubou-se a 37 °C por 30 minutos. Realizou-se a leitura a 595 nm em espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific®). Utilizou-se Sulfato Ferroso 2 mM para confecção da curva-padrão, diluído nas concentrações de 100, 200, 400, 800, 1000, 1200, 1500 e 1800 μM (FIGURA 11).

A partir da equação da reta das amostras, calculou-se a capacidade antioxidante equivalente de sulfato ferroso, cujos resultados foram expressos em μmol equivalentes de sulfato ferroso por g de amostra ($\mu\text{mol.eq.Sulfato ferroso.g}^{-1}$). Os cálculos foram realizados conforme descrito no item 3.8.2. Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

FIGURA 11 - CURVA PADRÃO E EQUAÇÃO DA RETA DO SULFATO FERROSO



FONTE: O autor (2020).

3.8.4 Ensaio de ORAC (Capacidade de absorção de radicais de oxigênio) do extrato e frações

O teste por ORAC foi realizado conforme metodologia proposta por Zulueta; Esteve; Frigola (2009). Extrato e frações foram testados nas concentrações de $50 \mu\text{g/mL}$. Utilizou-se trolox como padrão para confecção da curva analítica e PBS como branco do teste. Em microplacas de 96 poços, foram adicionadas $20 \mu\text{L}$ de amostra ou padrão e homogeneizados com $120 \mu\text{L}$ de fluoresceína ($61,2 \text{ nM}$). Posteriormente, a microplaca foi incubada por 10 min a 37°C com 3 min de agitação. Decorrido 10 min, foram adicionados às microplacas $60 \mu\text{L}$ de solução AAPH (19 mM) para dar início a reação. A intensidade de fluorescência (excitação = $485 \text{ nm}/20 \text{ nm}$ e emissão = $528/20 \text{ nm}$) foi verificada em modo cinético, com leitura em intervalos de 1 min, até que o valor da fluorescência atingisse valor igual ou inferior a 0,5% da fluorescência inicial. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM , pH 7,4. A atividade antioxidante foi expressa em μmol equivalente de trolox por 100g de amostra ($\mu\text{mol.trolox.100g}^{-1}$ de amostra).

O valor foi calculado a partir de uma curva de calibração da concentração de trolox em função da área sob a curva, calculada conforme a fórmula (10).

$$\text{Valor ORAC} = \left(\frac{AUC_{amostra} - AUC_{branco}}{AUC_{trolox} - AUC_{branco}} \right) \times \left(\frac{\text{Concentração trolox}}{\text{Concentração amostra}} \right) \quad (10)$$

AUC_{trolox} = Área sob a curva em um sistema contendo trolox em tampão fosfato 75 mM;

AUC_{trolox} = Área sob a curva em um sistema contendo a amostra avaliada;

AUC_{trolox} = Área sob a curva em um sistema contendo tampão fosfato 75 mM ou metanol;

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 + \dots + f_{90}/f_0 + f_{91}/f_0.$$

f_0 = fluorescência inicial no tempo 0 min.

f_i = fluorescência no tempo i .

Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

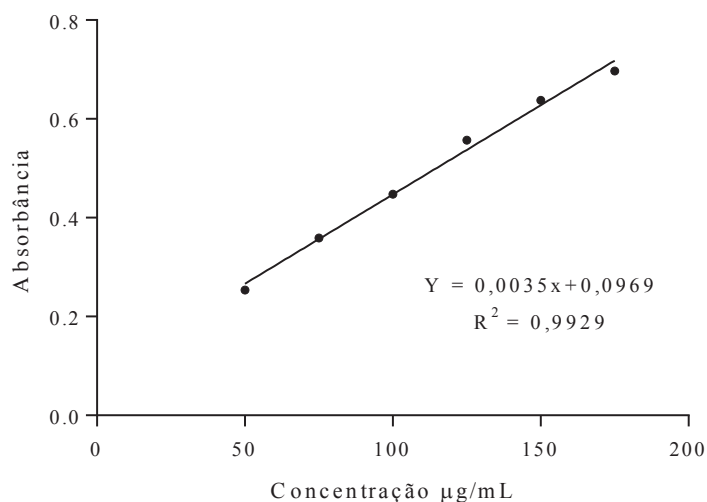
3.8.5 Capacidade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio

O potencial antioxidante do extrato e frações, foi avaliado pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio, descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999). As amostras foram avaliadas em 7 concentrações; 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Resumidamente, em tubos de ensaios com tampas, alíquotas de 0,3 mL da solução da amostra foram adicionadas a 3 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 3 M, fosfato de sódio 0,1 M e molibdato de amônio 0,03 M). Os tubos foram fechados e levados ao banho termostático a 95°C por 90 min. Após o resfriamento, transferiu-se 200 μL da solução para microplacas de 96 poços e a leitura realizada em espectrofotômetro (Multiscan FC, Thermo Scientific®) no comprimento de onda de 695 nm.

Para fins de comparação com o extrato e frações, utilizou-se o padrão Rutina (Merck®), avaliada nas mesmas concentrações que a amostra. Para confecção da curva padrão utilizou-se ácido ascórbico (FIGURA 12) nas concentrações de 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 $\mu\text{g/mL}$. A partir da equação da reta das amostras, calculou-se a capacidade antioxidante

equivalente em ácido ascórbico, cujos resultados foram expressos em mg equivalente ácido ascórbico por g de amostra (mg.AA.g^{-1} de amostra).

FIGURA 12 - CURVA PADRÃO E EQUAÇÃO DA RETA DO ÁCIDO ASCÓRBICO



FONTE: O autor (2020).

A partir da equação da reta das amostras, calculou-se a capacidade antioxidante equivalente em ácido ascórbico. Primeiramente, calculou-se a concentração equivalente a 200 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico conforme fórmula (11).

$$y = -ax + b \quad (11)$$

onde:

x = Absorbância correspondente a 200 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico

y = Concentração da amostra equivalente a 200 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico

A concentração da amostra encontrada em y foi dividida por 200 para obtenção do valor em g (gramas) conforme fórmulas (12) e (13).

$$Y_g (\text{gramas}) = \frac{y}{200} \quad (12)$$

onde:

y = Concentração da amostra equivalente a 200 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico

Y_g = Concentração da amostra em g de ácido ascórbico

Para encontrar o valor equivalente em ácido ascórbico representado em gramas, utilizou-se a fórmula (13).

$$Y_{eq.} = \frac{1}{Y_g} \quad (13)$$

onde:

Y_g = Concentração da amostra em g de ácido ascórbico

$Y_{eq.}$ = Concentração da amostra equivalente em g de ácido ascórbico

O resultado final (mg/g) foi obtido pela multiplicação de $Y_{eq.}$ por 1000 (fórmula 14).

$$\text{mg.AA.g}^{-1} = Y_{eq.} * 1 \quad (14)$$

onde:

$Y_{eq.}$ = Concentração da amostra equivalente em g de ácido ascórbico

* = Multiplicação

mg.AA.g^{-1} = Atividade antioxidante em mg equivalente de ácido ascórbico por g de amostra.

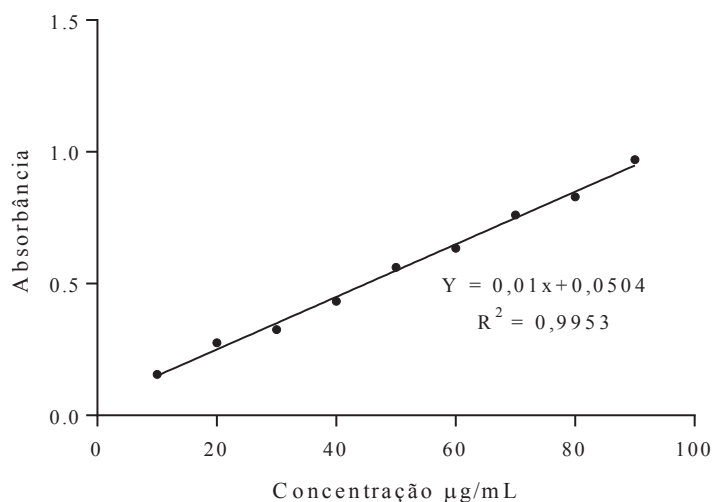
Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.8.6 Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Este ensaio foi realizado baseado em Zieliński; Kozłowska (2000), com adaptações para tubos de 1,5 mL tipo eppendorfs[®]. Extratos e frações foram analisados em 7 concentrações diferentes (100 – 400 µg/mL). Em eppendorfs[®] de 1,5 mL adicionou-se 600 µL de água destilada, 200 µL da amostra, padrão ou branco, 100 µL de reagente Folin 1N e 100 µL de Carbonato de sódio 25%. Após 30 minutos (25±5 °C sobre abrigo de luz), realizou-se a leitura (microplaca) em espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific[®]) a 700 nm.

Várias concentrações de ácido gálico; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 µg/mL, foram utilizadas para obtenção da curva de padrão e equação da reta (FIGURA 13).

FIGURA 13 - CURVA PADRÃO E EQUAÇÃO DA RETA DO ÁCIDO GÁLICO



FONTE: O autor (2020).

A partir da equação da reta do ácido gálico (fórmula 15), calculou-se o teor de compostos fenólicos, cujos resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por grama de amostra (mg.EAG.g⁻¹).

$$y = -ax + b \quad (15)$$

onde:

x = Contração da amostra em µg/mL equivalente de ácido gálico

y = Absorbância da amostra em µg/mL

Posteriormente realizou-se a conversão dos resultados para mg/g, conforme fórmulas (16) e (17).

$$X_g = \frac{x}{1000} \quad (16)$$

onde:

x = Contração da amostra em µg/mL equivalente de ácido gálico

X_g = Contração da amostra em g equivalente de ácido gálico

$$X_{\text{mg/g}} = \frac{X_g}{DA_{\text{g/mL}}} \quad (17)$$

onde:

X_g = Contração da amostra em g equivalente de ácido gálico

$X_{\text{mg/g}}$ = Contração da amostra em mg/g equivalente de ácido gálico

$DA_{\text{g/mL}}$ = Diluição da amostra utilizada no teste em g por mL.

Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

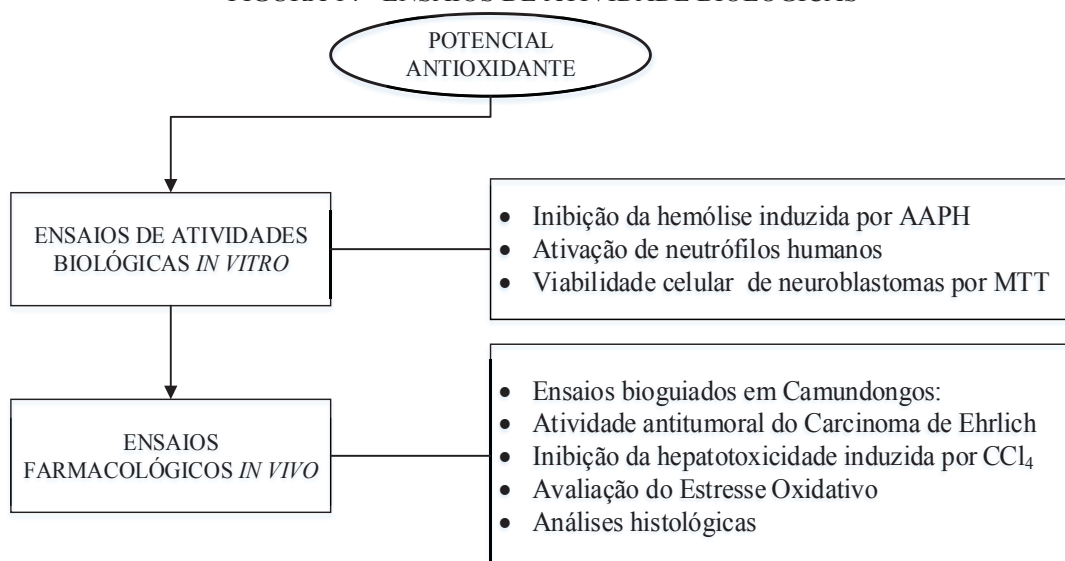
3.8.7 Teste estatístico de Correlação de Pearson

Para o teste de correlação de Pearson entre as atividades antioxidantes e o teor de compostos fenólicos, utilizou-se o programa estatístico SPSS versão 23.0. Para a interpretação dos valores de correlação de Pearson, os coeficientes (r) foram classificados em: muito fraco (0,0 – 0,2), fraco (0,2 – 0,4), moderado (0,4 – 0,7), forte (0,7 – 0,9) e muito forte (0,9 – 1,0), segundo Rowntree (1981), tendo $p < 0,05$ como significativo.

3.9 ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *C. glandulosus*

Após os ensaios de capacidade antioxidante, realizou-se ensaios de proteção hemolítica contra a ação do radical AAPH, bem como ensaio de ativação de neutrófilos humanos e atividade antitumoral em diferentes linhagens celular, para direcionamento das atividades farmacológicas (FIGURA 14).

FIGURA 14 - ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICAS



FONTE: O autor (2020).

3.9.1 Ensaio antioxidante em eritrócitos de carneiro induzido por AAPH, das frações acetato de etila e residual

3.9.1.1 Preparo da solução de eritrócitos

As amostras de sangue foram coletadas de voluntários saudáveis, em tubos contendo EDTA. Foram transferidos 3 mL de sangue para um tubo de falcon, centrifugando por 5 min. a 3000 rpm. O sobrenadante foi retirado e desprezado. O procedimento foi realizado até obtenção de sobrenadante límpido. A papa de hemácias resultante foi diluída a 5% em PBS (4 °C). O teste foi realizado com as frações, extrato bruto, óleo essencial e isolados das plantas, utilizando como referências as mesmas concentrações obtidas no teste de DPPH (BANERJEE, 2008).

3.9.1.2 Avaliação da capacidade hemolítica induzida por AAPH

O ensaio de capacidade hemolítica induzida por AAPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Banerjee et al. (2008). Utilizou-se as frações FAC e RES, em concentrações que variaram de 8 – 200 µg/mL. Para que os ativos contidos nas frações fossem absorvidos pelos glóbulos vermelhos, a solução de eritrócitos (180 µL) foi pré-incubada com as amostras (20 µL), por 30 min a 37 °C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante hemolisado foi retirado e desprezado. As células pré-tratadas com as frações,

foram submetidas à hemólise por meio de uma solução de PBS com AAPH 50 mM. A mistura reacional foi incubada por 3 horas a 37 °C e centrifugada a 3000 rpm. O sobrenadante foi retirado e colocado em microplacas de 96 poços, para leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A capacidade anti-hemolítica foi dada em porcentagem conforme fórmula (18) (RASOOL et al., 2015).

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Absorbância da amostra (ou padrão)} - \text{branco}}{\text{Absorbância do triton} - \text{branco}} \times 100 \quad (18)$$

Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.9.2 Ensaio de verificação de ânions superóxidos em neutrófilos humanos tratados com vitexina

3.9.2.1 Separação dos neutrófilos

O ensaio foi submetido e aprovado pelo comitê de ética para pesquisas em humanos (Número de registro CEP/SD: 1033.158.10.11) ANEXO 2. Para a análise de ativação dos neutrófilos, utilizou-se o método adaptado e modificado de Park, Fikrig e Smithwick (1968), Park e Good (1970), Levinsky et al. (1983), Markert, Andrews e Babior (1984) e Abreu et al. (2009).

Primeiramente procedeu-se a separação de neutrófilos, a partir de sangue de indivíduos saudáveis. Em um tubo de falcon, adicionou-se 36 mL de água destilada e 3 mL de sangue, homogeneizando delicadamente por 30 segundos. Em seguida, adicionou-se 12 mL de tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 4x (4 vezes mais concentrado), homogeneizando por 15 segundos, seguido de centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado para retirada das células que hemolisaram e ao sedimento foi adicionado 3 mL de PBS normal, ressuspensando, delicadamente, com auxílio de uma pipeta de pasteur.

Em outro tubo de falcon, colocou-se 3 mL de ficol Histopaque®-1077 (Ficoll PM400, diatrizoato de sódio e de cálcio dissódico de EDTA) e sob a parede do tubo, adicionou-se lentamente a suspensão de células, formando uma solução bifásica. Em seguida a solução foi centrifugada por 25 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e

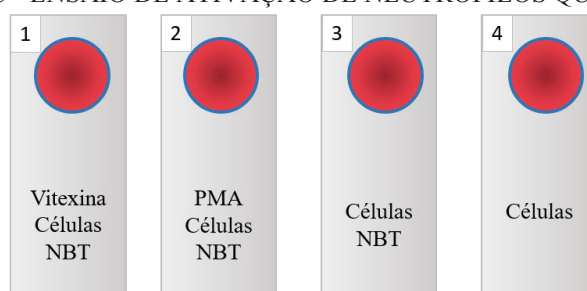
adicionado 3 mL de PBS normal, ressuspensando-se as células delicadamente. A suspensão foi novamente centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspensado com 200 μ L de PBS normal.

3.9.2.2 Teste de verificação de ânions superóxidos em neutrófilos humanos qualitativo

Neste ensaio avaliou-se a ativação dos neutrófilos pela vitexina. A suspensão de células (50 μ L), obtida no item 3.9.2.1, foi adicionada à lâminas limpas e secas previamente tratadas com a amostra de vitexina e PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato) na concentração de 10 μ g/mL.

Após adição das células as lâminas foram incubadas à 36,8 °C, em câmara úmida por 20 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas delicadamente por 3x, com o auxílio de pipeta de pasteur, utilizando-se PBS normal. Adicionou-se NBT (*Nitroblue tetrazolium*) nas lâminas 1, 2 e 3 conforme a FIGURA 15.

FIGURA 15 - ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS QUALITATIVO



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Ilustração das lâminas utilizadas no ensaio de ativação de neutrófilos pelo método qualitativo. No círculo vermelho exemplifica o local de depósito das amostras, reagentes e solução de eritrócitos conforme descrito no método.

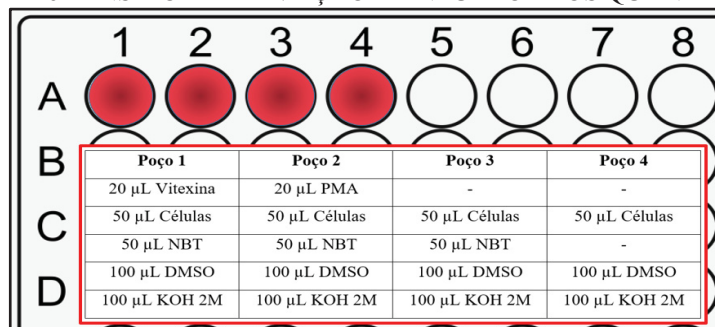
As lâminas foram levadas à estufa por mais 15 minutos. Em seguida, lavou-se novamente as lâminas (3x com PBS normal) e adicionou-se 2 gotas de safranina 0.25%. Após 10 minutos, lavou-se as lâminas e realizou-se a análise microscópica em lentes de imersão (aumento de 100x). Os resultados foram apresentados em imagens fotográficas por meio da visualização da presença ou ausência de depósitos de formazan nas células.

3.9.2.3 Teste de verificação de ânions superóxidos em neutrófilos humanos quantitativo

Neste ensaio adicionou-se 20 μ L de Vitexina e PMA (na concentração de 10 μ g/mL) no poço 1 e 2 da microplaca de 96 poços com fundo chato, deixando as amostras secarem por

48 horas antes do experimento. Posteriormente, obteve-se a suspensão de células e adicionou-se 50 µL nos poços 1, 2, 3 e 4 conforme FIGURA 16.

FIGURA 16 - ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS QUANTITATIVO



	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4				
C	20 µL Vitexina	20 µL PMA	-	-				
D	50 µL Células	50 µL Células	50 µL Células	50 µL Células				
	50 µL NBT	50 µL NBT	50 µL NBT	-				
	100 µL DMSO	100 µL DMSO	100 µL DMSO	100 µL DMSO				
	100 µL KOH 2M	100 µL KOH 2M	100 µL KOH 2M	100 µL KOH 2M				

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Ilustração da microplaca de 96 poços utilizada no ensaio de ativação de neutrófilos pelo método quantitativo. Cada poço exemplifica o local de depósito das amostras, reagentes e solução de eritrócitos conforme descrito no método.

Após a adição das células, incubou-se a microplaca em câmara úmida à 36,8 °C por um período de 20 minutos. Em seguida, adicionou-se PBS normal aos poços retirando o sobrenadante com auxílio de micropipeta, repetindo este procedimento por 4x, para realizar a lavagem dos poços. Adicionou-se 50 µL de NBT nos poços 1, 2 e 3, reincubando a microplaca por 15 minutos (em câmara úmida à 36,8 °C). Posteriormente, realizou-se a lavagem dos poços com PBS normal, por mais 3x. Por fim, adicionou-se 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido) em todos os poços, seguido da adição de 100 µL de Hidróxido de Potássio 2 M (KOH 2M).

Em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Multiskan FC, Thermo Scientific®), realizou-se a agitação da placa por 1 minuto. A adição da solução de hidróxido de sódio 2 M e do DMSO é capaz de gerar a ruptura da membrana celular, liberando os depósitos de formazan de cor azulada. Dessa forma, a intensidade da ativação dos neutrófilos foi avaliada pela densidade ótica obtida à 560 nm. Para obtenção da média de densidade ótica do NBT, realizou-se o cálculo conforme fórmula (19):

$$NBT = \frac{(Abs_3 + Abs_4)}{2} \quad (19)$$

onde:

Abs₃ = Absorbância obtida no poço 3

Abs₄ = Absorbância obtida no poço 4

NBT = Média do valor de NBT

Para a verificação das diferenças entre as médias da VTX, PMA e NBT, foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.9.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT de neuroblastoma humanos utilizando-se extrato e frações de *C. glandulosus*

3.9.3.1 Cultura celular de CHLA-20 e BE-M17

As linhagens celulares utilizadas foram gentilmente cedidas pelo laboratório de cultivo celular do núcleo da Pós-graduação em Ciências da Saúde, da PUC-PR. Foram testados os extratos e frações em linhagens ATCC (*American Type Culture Collection*) de CHLA-20 e BE-M17. As células obtidas foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (FBS).

3.9.3.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT

Os ensaios de viabilidade celular com as linhagens CHLA-20 e BE-M17, foram realizados em dois experimentos independentes. As células foram centrifugadas e ressuspendidas no mesmo meio de cultivo. Posteriormente, foram contadas em placa de Neubauer para obtenção de uma suspensão contendo 1×10^6 células/mL. Esta suspensão foi distribuída em placas de 96 poços em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de soro fetal bovino. A placa foi incubada à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂, por um período de 48 horas, para crescimento e adesão celular. O procedimento foi realizado em triplicata, para cada concentração da amostra utilizada. Após este período, as monocamadas formadas, receberam o tratamento com o extrato EBR e frações HEX, CLO, FAC e RES de *C. glandulosus*, nas concentrações: 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL.

Em seguida, as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, os sobrenadantes foram removidos, e ao sedimento, foi acrescentado 20 µL de uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) na concentração de 5 mg/mL e 180 µL do meio de cultura. As células foram novamente incubadas por 3 horas, e o sobrenadante, cuidadosamente removido. O formazan formado pelas células viáveis foi solubilizado com 100 µL de DMSO e a leitura da absorbância, realizada em leitor de microplaca no comprimento de onda 550 nm

(SIEUWERTS et al., 1995). Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular, calculados conforme a fórmula (20).

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do Controle}} \times 100 \quad (20)$$

Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.10 ENSAIOS DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS *IN VIVO* DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E VITEXINA

3.10.1 Avaliação da atividade antitumoral em modelo experimental de tumor de Ehrlich em camundongos *Swiss* tratados com extrato bruto, fração acetato de etila e vitexina

3.10.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos (21 - 35 g) obtidos do biotério central da Universidade Federal do Paraná – UFPR (Curitiba-Brasil). Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Metabolismo e Toxicologia do Departamento de Farmacologia da UFPR, em salas com temperatura constante (entre 21 a 23 °C), obedecendo a fases claro/escuro de 12 horas e com exaustão de ar. Os animais foram acondicionados em caixas com 7 camundongos/gaiola, com livre acesso à ração e água mineral (Ouro Fino®). Os animais foram alocados em caixas de 1666 cm² (Comprimento: 49 cm; Largura: 34 cm; Altura: 16 cm). Em cada caixa foram colocadas 2 a 3 ‘igloos’ (Insight®) próprios para camundongos, para enriquecimento ambiental. Os procedimentos deste estudo foram revisados e aprovados pelo comitê de ética animal do setor de Ciências Biológicas da UFPR (certificado número 1148) ANEXO 3.

3.10.1.2 Inoculação do tumor sólido de Ehrlich

As células tumorais de Ehrlich foram mantidas congeladas (-80 °C) no laboratório de Metabolismo e Toxicologia do Departamento de Farmacologia da UFPR. Para manter o

tumor de Ehrlich na forma ascítica, foram inoculadas 2×10^6 células/animal por via intraperitoneal (i.p.) em camundongos fêmeas. Após um período de 7 dias, com o crescimento do tumor na forma ascítica, as células foram colhidas de forma asséptica, em aproximadamente 3 mL, seguido de centrifugação a 1.000g por 3 minutos e realizado a contagem.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células no pellet foram lavadas três vezes com solução salina e as células viáveis inoculadas novamente em outro animal, e assim sucessivamente, totalizando 3 animais. Completados 5 ‘repiques’ verificou-se a viabilidade celular pelo método de exclusão pelo azul de tripan em câmara de Neubauer (viabilidade 98% células) (DE FATIMA PEREIRA et al., 2014; EL-SISI et al., 2014). Após a obtenção de células viáveis, inoculou-se 0,2 mL de células de carcinoma, por via subcutânea, na concentração de 2.10^6 células/animal, no membro pélvico direito dos animais dos grupos experimentais (ABDIN et al., 2014; DE FATIMA PEREIRA et al., 2014).

3.10.1.3 Avaliação da atividade antitumoral dos extratos e vitexina no modelo de carcinoma sólido de Ehrlich:

Após o a inoculação das células de Ehrlich por via subcutânea, no dia 0, o volume tumoral foi medido todos os dias, a partir do 7º dia, com o auxílio de um paquímetro avaliando-se o volume maior e menor. O tratamento iniciou-se a partir do 1º dia até o 21º. O tratamento foi realizado com o extrato bruto (EBR), fração acetato de etila (FAC) e o isolado Vitexina (VTX) solubilizados em água mineral, conforme a TABELA 1.

TABELA 1 - TRATAMENTO UTILIZADO NO MODELO EXPERIMENTAL PARA TUMOR DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS *SWISS*

Tratamento	Dose	Via de administração	Frequência
VEH	Água mineral	v.o	<i>Ad libitum</i> (21 dias)
MTX	2,5 mg/kg	i.p	1 vez ao dia a cada 3 dias (21 dias)
EBR	200 mg/kg	v.o	1 vez ao dia (21 dias)
FAC	100 mg/kg	v.o	1 vez ao dia (21 dias)
VTX	2 mg/kg	v.o	1 vez ao dia (21 dias)

FONTE: O autor (2020).

NOTA: v.o: via oral; i.p: via intraperitoneal; VEH: Veículo (Água mineral); MTX: Metotrexato; EBR: Extrato Bruto; FAC: Fração acetato de etila e VTX: Vitexina.

No 22º dia de tratamento os animais foram anestesiados e eutanaziados. Utilizou-se cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via i.p como anestésicos. A eutanásia foi realizada por punção diafragmática, induzindo a parada respiratória sob anestesia. O sangue

foi coletado por punção da veia cava abdominal para avaliação do perfil hematológico e o plasma separado e armazenado em freezer -20 °C, para avaliação do perfil bioquímico. Posteriormente realizou-se a coleta de materiais biológicos (Tumor, fígado, rins, pulmão e baço) por meio de laparotomia. Os órgãos foram pesados para determinação do peso relativo e o tumor examinado por análises histológicas. Os animais eutanasiados, foram armazenados em freezer -20 °C até o descarte adequado.

3.10.1.4 Análise estatística

Para avaliação dos dados, utilizou-se o teste de variância *one-way* (ANOVA) seguido do *post-hoc* de Tukey para analisar as diferenças significativas entre o controle VEH e os grupos ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA E EFEITO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR CCL₄ EM CAMUNDONGOS *SWISS*

3.11.1 Animais

O experimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Metabolismo do Departamento de Farmacologia da UFPR. Foram utilizados camundongos Swiss, machos (25-38 g) obtidos do biotério central da Universidade Federal do Paraná – UFPR (Curitiba-Brasil). Os animais foram mantidos em salas com temperatura constante (entre 21 a 23 °C), obedecendo os ciclos claro/escuro de 12 horas, com exaustão de ar. Os animais foram acondicionados em caixas (Comprimento: 49 cm; Largura: 34 cm; Altura: 16 cm) contendo de 2 a 3 igloos (Insight®), para enriquecimento ambiental. Em cada caixa foram colocados de 7 camundongos, com livre acesso à ração e água mineral. O teste foi realizado respeitando-se as normas de bem-estar animal e o trabalho revisado e aprovado pelo comitê de ética animal do setor de Ciências Biológicas da UFPR (certificado número 1148).

No último dia do experimento, os animais passaram por restrição alimentar de 12 horas, antes da eutanásia. Posteriormente, foram anestesiados (Cetamina 80 mg/Kg e Xilazina 10 mg/Kg via i.p.) e eutanaziados. Os animais foram eutanasiados por punção do diafragma, onde ao seccionar o músculo diafragma para coletar os pulmões, foi desfeita a pressão negativa do tórax, implicando, imediatamente, em parada respiratória. O sangue foi coletado

por punção da veia cava abdominal para avaliação do perfil hematológico e o plasma separado e armazenado (- 20°C) para avaliação do perfil bioquímico. Os materiais biológicos (Fígado, rins, pulmão e baço) foram coletados por meio de laparotomia, para determinação do peso relativo e o fígado examinado por análises histológicas. Os animais eutanasiados, foram armazenados em freezer - 20°C até o descarte adequado.

3.11.2 Teste de hepatoproteção e tratamento

No teste de hepatoproteção utilizou-se o extrato bruto (EBR), a fração acetato de etila (FAC), que obtiveram os melhores resultados para os testes antioxidantes e biológicos, também utilizou-se o isolado Vitexina (VTX), oriundo da fração acetato de etila. As amostras foram solubilizadas em água mineral e o número de animais por grupo foi calculado utilizando-se o software G-power 3.1, no qual obteve-se um $n=7$ animais (TABELA 2), e as concentrações foram estimadas baseadas na concentração utilizada no estudo de hepatoproteção de Ahmed et al. (2002) para *C. oblongifolius* em ratos, e o valor foi recalculado para camundongos por meio do cálculo da taxa metabólica.

TABELA 2 - GRUPO DE ANIMAIS E TRATAMENTOS DO ENSAIO DE HEPATOPROTEÇÃO

Grupo	Tratamento	Frequência
VEH	CCl ₄ (i.p.)	Dia 6 e 7.
NAIVE	Água mineral (v.o.)	<i>Ad libitum</i> (7 dias)
NAC 100 mg/Kg	CCl ₄ + N-acetilcisteína (v.o.)	Todos os dias, por 7 dias
NAC+ 100 mg/Kg	CCl ₄ + N-acetilcisteína (v.o.)	Todos os dias, por 7 dias
EBR 350 mg/Kg	EBR + CCl ₄ (v.o.)	Todos os dias, por 7 dias
FAC 350 mg/Kg	FAC + CCl ₄ (v.o.)	Todos os dias, por 7 dias
VTX 3,5 mg/kg	VTX CCl ₄ (v.o.)	Todos os dias, por 7 dias

FONTE: O autor (2020).

NOTA: VEH (Água ultrapura + CCl₄ 2%, 5 mL/kg), NAIVE (Água mineral), NAC (N-acetilcisteína 100 mg/Kg), NAC+ (N-acetilcisteína 100 mg/Kg + CCl₄), EBR (Extrato bruto 350 mg/kg + CCl₄), FAC (Fração acetato de etila 350 mg/kg + CCl₄) e VTX (vitexina 3,5 mg/kg + CCl₄).

Os animais foram tratados por via oral (v.o.) com os compostos ou água mineral uma vez por dia durante 7 dias. Nos dias 6 e 7, 2 h após o tratamento oral, os animais foram induzidos à hepatotoxicidade com CCl₄ (v.o.). Após a eutanásia o sangue foi coletado para realizar os testes bioquímicos, hematológicos e de estresse oxidativo. O fígado foi rapidamente removido, pesado e congelado em nitrogênio líquido para posterior análise. Baço, rins e pulmões também foram retirados, pesados e avaliados quando a morfologia macroscópica.

3.11.3 Análise de hemograma e parâmetros bioquímicos

Foram realizados hemogramas das amostras, por meio automatizado (equipamento). O sangue foi centrifugado a $3000 \times g$ por 5 min e plasma obtido para realização da atividade da alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e fosfatase alcalina (ALP), utilizando-se kits comerciais (Kovalent, São Gonçalo, Brasil). Foram realizadas também as análises para creatinina, ureia e glicose (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, Brasil), utilizando-se o equipamento automatizado Mindray BS-200 (Shenzhen, China).

3.11.4 Parâmetros do estresse oxidativo

O tecido hepático foi homogeneizado em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS; pH 6,5) e centrifugado ($10.000 \times g$, 4 °C, 20 min). O sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade da catalase (CAT) (Aebi, 1984); da superóxido dismutase (SOD) (Gao et al., 1998); da glutathione S-transferase (GST) (Habig et al. 1974) e medir os níveis de glutathione reduzida (GSH) (Sedlak e Lindsay, 1968) e peroxidação lipídica (LPO) (Jiang et al., 1991). A maioria dos parâmetros de estresse oxidativo foi expressos como quantidade de proteína nas amostras de fígado, determinada utilizando-se o método de Bradford (1976) com albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

a) Determinação da atividade da enzima Catalase (CAT)

A enzima catalase é fundamental na reação do peróxido de hidrogênio (formado pela reação catalisada pela SOD) em oxigênio molecular, favorecendo a eliminação de radicais livres que causam danos celulares e danos ao DNA (AEBI, 1984; NASCIMENTO et al., 2006). A atividade da CAT foi determinada nas amostras de fígado, conforme descrito por Aebi (1984). Os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteínas}^{-1}$.

b) Determinação da atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e, portanto, exerce uma função importante contra a toxicidade do oxigênio livre, sendo a primeira linha de defesa do organismo contra os radicais livres (MARKLUND et al., 1982). Para as análises bioquímicas da SOD as amostras de fígado foram homogeneizadas em solução tampão fosfato pH 6,5, a uma diluição de 1:10, e centrifugadas a velocidade de 10.000 g durante 10 minutos à 4 °C. A atividade da SOD foi quantificada pela capacidade da enzima, presente no tecido hepático, em inibir a auto-

oxidação do reagente pirogalol. Os resultados foram expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína total (U SOD/mg proteína).

c) Determinação da atividade da Glutathione-S-transferase (GST)

A glutathione S-transferase (GST) constitui uma família de enzimas que catalisa xenobióticos ativados em glutathione reduzida (GSH), neutralizando os sítios eletrofílicos resultando em produtos hidrofílicos, protegendo as células do organismo de produtos tóxicos (HABIG et al., 1974; RAMSAY; DILDA, 2014). A fim de determinar a atividade da GST no fígado, as amostras foram homogeneizadas em solução tampão fosfato pH 6,5, a uma diluição de 1:10 e centrifugadas a velocidade de 10.000 g durante 10 minutos, sob uma temperatura de 4 °C e 5.000 g. As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a GSH (HABIG et al., 1974). O aumento linear da absorbância a 340 nm foi avaliado, utilizando-se o coeficiente de extinção de 9,6 mmol.cm⁻¹ e a atividade da GST expressa em mmol/min/mg de proteína.

d) Determinação da Glutathione Reduzida (GSH)

A glutathione reduzida (GSH) é a maior molécula antioxidante do organismo, envolvida na defesa do organismo, na modulação da proliferação celular e na função imune (LU, 2013; RAMSAY; DILDA, 2014). Para a medida dos níveis de GSH hepático as amostras foram submetidas de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Os resultados foram expressos em µg de GSH/g de tecido⁻¹.

e) Determinação da Peroxidação Lipídica (LPO)

A excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em condições de estresse oxidativo pode derivar da produção de produtos oxidados de ácidos graxos poli-insaturados, denominados de produtos derivados da peroxidação lipídica (LPO), contribuindo em várias anormalidades celulares e fisiopatológicas. Para determinar a peroxidação lipídica nas amostras de fígado foi realizado o método de FOX ou xilenol laranja conforme descrição de Jiang e colaboradores (JIANG et al., 1991).

3.11.5 Análise estatística

Para avaliação dos dados, utilizou-se o teste de variância *one-way* (ANOVA) seguido do *post-hoc* de Tukey para analisar as diferenças significativas entre o controle VEH e os grupos ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL SECO

4.1.1 Determinação do teor de umidade e de cinzas

O teor de umidade e cinzas das partes aéreas secas de *C. glandulosus*, encontra-se disposto na TABELA 3. O material vegetal apresentou umidade dentro dos limites permitidos pela farmacopeia brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019), cujo valor máximo é de 14%, sendo este fator primordial na manutenção da qualidade e das propriedades terapêuticas da planta. O excesso de umidade pode propiciar o desenvolvimento de bactérias e fungos, além de permitir a ação de enzimas que podem degradar constituintes químicos (VASCONCELOS et al., 2012; SIMÕES et al., 2017; BRASIL, 2019).

TABELA 3 – DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS DAS PARTES AÉREAS DE *Croton glandulosus*

Determinação	Material vegetal
Umidade	11,57% ± 0,09
Cinzas	4,52% ± 0,14

FONTE: O autor (2020).

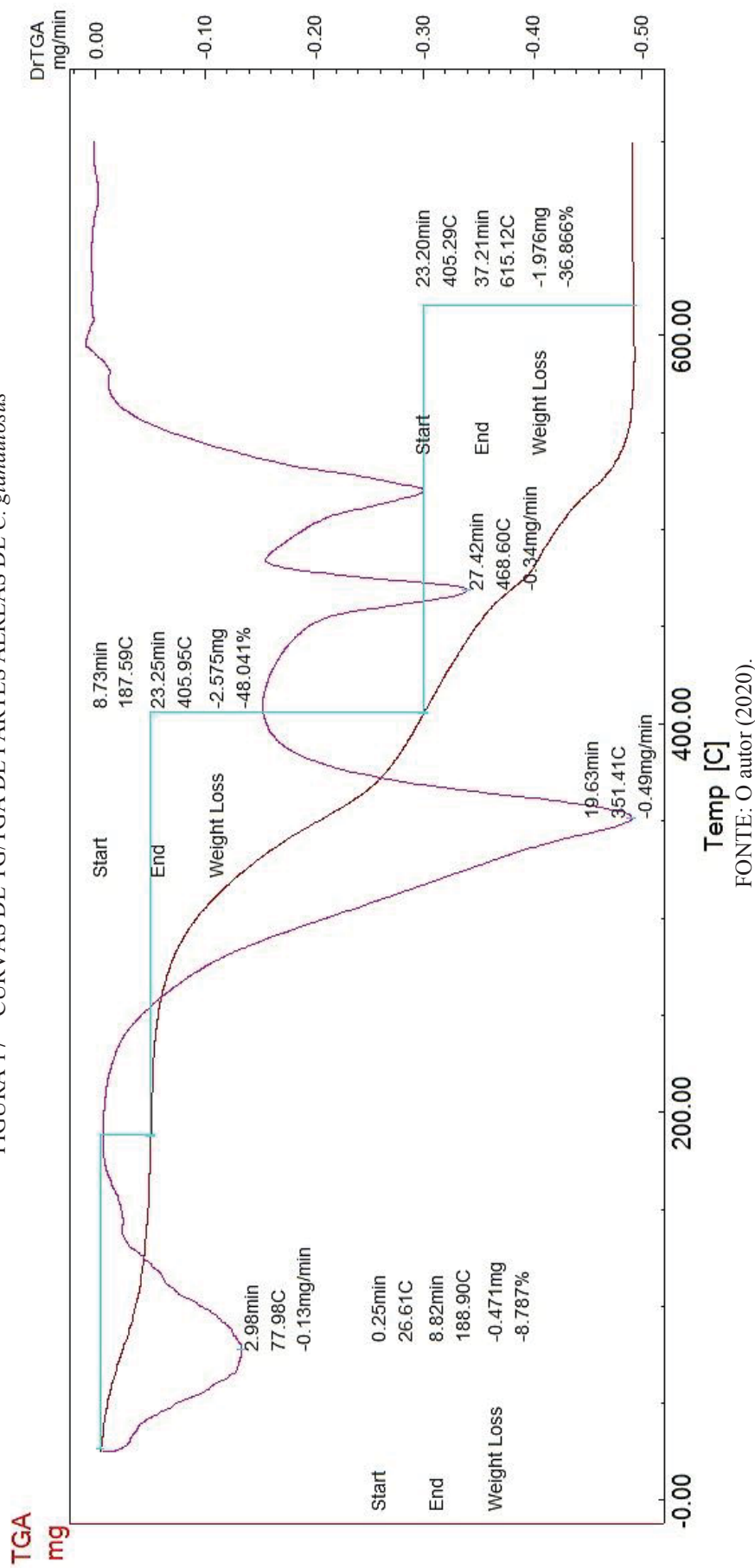
NOTA: Resultados expressos em média aritmética ± Desvio Padrão.

O teor de cinzas determinado na amostra seca, permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis e serve de parâmetro para possíveis adulterações do material vegetal (ARAUJO et al., 2006; SIMÕES et al., 2017; BRASIL, 2019;).

4.2.2 Estudo termoanalítico

Por meio do método termogravimétrico e curvas de TG/DTG, pode-se perceber o padrão de degradação térmica ocorrido nas partes aéreas de *C. glandulosus*, pela ocorrência de três etapas de degradação (FIGURA 17). O teor de cinzas foi obtido a partir da porcentagem do produto de decomposição térmica, em uma temperatura de 600 °C, equivalente a 6,206% de matéria não degradada, o que corresponde aos sais minerais ou impurezas contidas na amostra, considerando que a análise foi realizada sob fluxo de ar sintético.

FIGURA 17 – CURVAS DE TG/TGA DE PARTES AÉREAS DE *C. glandulosus*



FONTE: O autor (2020).

Na primeira etapa, obteve-se uma perda de 8,78% de massa, o que corresponde a perda de umidade do material vegetal. Ao compararmos os resultados obtidos para umidade e cinzas, pelo método gravimétrico (TABELA 3) e por análise termogravimétrica (TABELA 4), percebemos diferenças que são justificáveis pela maior precisão do método termogravimétrico (ASTM, 1993).

TABELA 4 – DETERMINAÇÃO TERMOGRAVIMÉTRICA E GRAVIMÉTRICA DAS PARTES AÉREAS DE *C. glandulosus*.

Perda de massa	Termogravimetria (%)	Gravimetria (%)
1º	8,78	11,57
2º	48,04	
3º	38,86	

FONTE: O autor (2020).

O processo de degradação dos constituintes bioativos de *C. glandulosus* inicia-se apenas a 188 °C, com uma perda de massa correspondente a 48,041%, a qual provavelmente se deve à oxidação e decomposição da matéria orgânica, como taninos e flavonoides (SOUZA, 2015), degradação térmica dos triglicerídeos, principalmente os constituídos por ácidos graxos poli-insaturados (BENÍCIO et al., 2009), assim como carboidratos e demais compostos orgânicos (ARAÚJO et al, 2006).

A terceira etapa de degradação térmica inicia em 405°C com perda equivalente a 38,86%, que corresponde à queima do material carbonáceo (Compostos polimerizados, de estruturas mais rígidas, celulose e ligninas) formado na etapa anterior. Como a matriz vegetal é complexa, por apresentar uma composição química ampla e diferenciada, o comportamento cinético é diversificado para cada espécie, e em geral, reflete o comportamento de suas substâncias majoritárias (ARAGÃO et al., 2002).

4.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A composição fitoquímica preliminar qualitativa dos extratos aquoso e hidroalcoólico 20% está apresentada na TABELA 5 e 6. No ensaio de taninos (TABELA 5), a espécie *Croton glandulosus*, apresentou reação positiva para a presença de flavonoides, resultante da formação de coloração verde característica.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO 20% DE *C. glandulosus*

Análises fitoquímicas	Extrato aquoso
Heterosídeos antociânicos	-
Heterosídeos saponínicos	-
Heterosídeos cianogênicos	-
Taninos	+
Pesquisa de amino grupos	+
Ácidos Fixos	-
Ácidos voláteis	-

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Símbolo + é indicativo de reação positiva, símbolo - é indicativo de reação negativa.

No extrato hidroalcoólico (TABELA 6), a reação para heterosídeos flavônicos, indicou a presença de flavonas na fração acetato de etila e remanescente, por meio do aparecimento de coloração amarela.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO 20% DE *C. glandulosus*

Grupos Químicos	Análises	FHX	FCL	FAE	FRE
Alcaloides	Reativo de Mayer	-	-	-	-
	Reativo de Dragendorff	-	-	-	-
	Reativo de Bourchardat	-	-	-	-
Flavonoides	Leucoantocianidinas	-	-	-	-
	Heterosídeos Flavônicos	-	-	+	+
	Oxálico Bórico	-	-	-	-
	Pacheco	-	-	-	-
	Zinco em HCl	-	-	-	-
Cumarinas	Fluorescência em UV	-	-	-	-
Iridoides	Floroglucinol	+	+	+	-
	Ácido sulfúrico	-	-	-	-
	Cristais de vanilina e Ácido sulfúrico	+	+	-	-
Antraquinonas	Bomtrâger	-	-	-	-
Esteroides/ Triterpenos	Liebermann Bouchard	+	+	+	-
	Keller Kelliani	+	+	+	-

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Símbolo + indicativo de reação positiva, símbolo - indicativo de reação negativa. Fração hexânica (FHX); Fração clorofôrmica (FCL); Fração acetato de etila (FAE); Fração residual (FRE).

O gênero *Croton* tem demonstrado significativa presença de flavonoides, e segundo Paredes et al. (1985), alguns flavonoides tem apresentado atividade hipotensora em animais, como por exemplo o estudo de Guerreiro et al. (2002), que estudando a espécie de *Croton schiedeanus*, observou efeito anti-hipertensivo e vasorelaxante em ratos. Shahwar et al., (2015) estudou a espécie de *Croton sparsiflorus*, associando a presença de compostos fenólicos com a atividade antioxidante e inibidora de acetilcolinesterase, principal mecanismo de tratamento da doença de Alzheimer, sugerindo que esta espécie pode ser promissora em estudos futuros para o tratamento desta doença.

Vários estudos têm demonstrado a presença de flavonas polimetoxiladas em espécies de *Croton*, como *Croton cajucara* (MACIEL et al., 2000), *Croton schiedeanus* Schlecht

(GUERRERO et al., 2002), *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. (GONZÁLEZ-VÁZQUEZ et al., 2006) e *Croton caudatus* (ZOU et al., 2010). Segundo Zou et al. (2010), este fitoquímico pode ser utilizado como marcador quimiotaxonômicos para espécies do gênero.

O ensaio para substâncias iridoidais apresentou reação positiva para iridoides glicosídeos nas frações hexano, clorofórmio e acetato de etila; e positiva para iridoides não glicosídeos nas frações hexano e clorofórmio. Os iridoides são monoterpenos biossintetizados a partir do isopreno. Frequentemente são intermediários na biossíntese de alcaloides e geralmente são encontrados, nas plantas ligados à glicose, denominados assim como glicosídeos. Substâncias iridoidais isoladas e purificadas podem apresentar atividades farmacológicas como neuroprotetora, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora, cardioprotetora, hipoglicêmica, hipolipêmica, analgésica, antiespasmódica, purgativa, antiviral, antimicrobiana, imunomoduladora, antialérgica, anti-mutagênica, anti-leishmaniose e moluscicida (BAS et al., 2007; DINDA; DEBNATH; HARIGAYA, 2007; TUNDIS et al., 2008; VILLASEÑOR, 2008).

Para a reação de Keller Kelliani, os extratos hexano, clorofórmio e acetato de etila, apresentaram reação positiva para triterpenoides, por meio da formação da cor verde característica. Estudos de Isuárez et al. (2012) constataram a presença de esteroides e triterpenoides na espécie *Croton micans* Sw, cuja avaliação farmacológica sugere propriedades medicinais, nesta e em outras espécies de *Croton*, como efeitos analgésicos, anti-histamínicos, bloqueador ganglionar, anti-hipertensivo e atividade citotóxica.

Várias espécies do gênero *Croton* têm demonstrado a presença de substâncias do metabolismo secundário, são de grande interesse medicinal, como flavonoides, alcaloides e principalmente terpenoides (RANDAU et al., 2004; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007 CUNHA et al., 2014). Furlan et al. (2015), estudou 9 espécies argentinas de *Croton* e verificou alta atividade antioxidante dos extratos. A espécie de *Croton* campestres estudada por Matias et al. (2011), apresentou potencial contra a resistência bacteriana à antibióticos. Há também, outros estudos que relataram atividade larvicida desta espécie, contra *Aedes aegypti* (LIMA et al., 2006). Além disso, Gupta et al., (2003), estudou o extrato clorofórmico de *Croton roxburhii*, o qual indicou a presença de alcaloides, triterpenoides e esteroides, por método qualitativo, constatando em animais, o efeito antifertilidade do extrato do extrato.

4.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. glandulosus*: ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

4.4.1 Extração e caracterização química do óleo essencial

As partes aéreas de *Croton glandulosus*, apresentaram um rendimento de 0,12% de óleo essencial e as características organolépticas demonstraram um óleo com cor amarelo-esverdeado, com odor doce e agradável. A análise cromatográfica do óleo permitiu o reconhecimento de 97,49% dos compostos com a predominância de sesquiterpenos (89,95%) e em menor proporção de álcoois, cetonas e aldeídos (7,21%), cujos respectivos tempos de retenção, índices de retenção e porcentagens, estão sumarizados na (TABELA 7).

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. glandulosus*

Grupos químicos	Compostos	TR	IRc	IRt	(%)
Acetato	Acetato de bornil	19.719	1291	1287	0.15
	δ -Elemeno	21.926	1342	1335	0.36
	α -Ilangeno	23.633	1381	1373	1.68
	β -Bourboneno	24.046	1390	1387	0.24
	β -Elemeno	24.334	1397	1389	0.69
	α -Gurjuneno	25.124	1415	1409	0.43
	β -Cariofileno	25.576	1426	1417	53.24
	β -Copaeno	25.948	1435	1430	0.17
	γ -Elemeno	26.116	1439	1434	1.44
	Aromadendreno	26.371	1445	1439	0.23
	Germacreno B	31.327	1566	1559	4.50
	9-epi-(β)-Cariofileno	27.318	1467	1464	0.66
	γ -Muuroleno	27.962	1483	1478	0.38
	γ -Amorfeno	28.163	1488	1495	6.52
Sesquiterpenos	N-Pentadecano	28.693	1500	1500	0.63
	Biciclogermacreno	28.832	1504	1500	8.59
	α -Muuroleno	28.964	1507	1500	0.29
	γ -Cupreneno	29.907	1530	1532	2.73
	(E,E)- α -Farneseno	29.187	1512	1505	0.37
	γ -Cadineno	29.536	1521	1513	0.35
	α -Humuleno	27.001	1460	1452	6.45
	Palustrol	31.755	1576	1567	0.21
	Espatulanol	32.214	1588	1577	1.91
	Oxido de cariofileno	32.385	1592	1582	3.88
Álcoois, Cetonas e aldeídos	α -Muurolol	34.697	1652	1644	1.21
	N-Heptadecano	36.550	1700	1700	0.18
Outros		32.865	1604	--	0.75
		33.439	1619	--	0.22
		35.087	1662	--	0.26
		35.237	1666	--	1.30
Total (Identificado) 97,49		Total (não identificado) 2,53			

FONTE: O autor (2020).

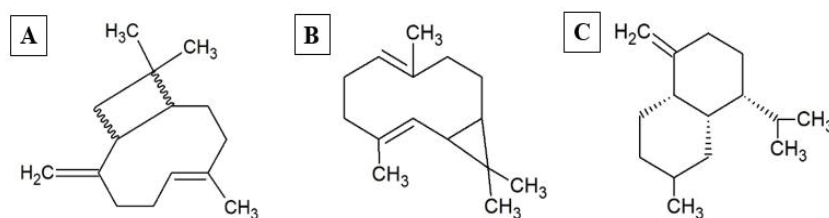
NOTA: TR: Tempo de retenção (minutos), IRt: Índice de retenção (Adams, 2007), IRc: Índice de retenção calculado, %: Porcentagem do componente.

O teor de sesquiterpenos encontrado no óleo de *C. glandulosus* é comum nas espécies de *Croton* (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007) e corrobora outros estudos de

óleo essencial de deste gênero, nos quais obteve-se altas porcentagens destas substâncias (SYLVESTRE et al., 2006; ANGÉLICO et al., 2012; VUNDA et al., 2012).

Os constituintes químicos majoritários foram os sesquiterpenos β -cariofileno (53,24%), Biciclogermacreno (8,59%) e o γ -amorfeno (6,52%) (FIGURA 18). O β -cariofileno apresentou alta quantidade no óleo quando comparado à espécie de *Croton Heliotropiifolius*, cujo teor foi de 15,9% (ANGÉLICO et al., 2012). Reporta-se na literatura inúmeros trabalhos sobre óleos essenciais ricos em sesquiterpenos, apresentando o β -cariofileno como principal componente, com potencial biológico e farmacológico (VIVEROS-PAREDES et al., 2017).

FIGURA 18 - ESTRUTURA QUÍMICA DO β -CARIOFILENO (A), BICICLOGERMACRENO (B) E γ -AMORFENO (C)



FONTE: O autor (2020).

Outras espécies do gênero *Croton* também apresentam o β -cariofileno entre os compostos majoritários, tais como *C. sonderianus* (SANTOS et al., 2005); *C. flavens* (SYLVESTRE et al., 2006); *C. nepetaefolius* (LIMA-ACCIOLY et al., 2006; FONTENELLE et al., 2008); *C. palanostigma* (BRASIL et al., 2009); *C. argyrophyllus* (MORAIS et al., 2006; RAMOS et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014); *C. conduplicatus* (SILVA ALMEIDA et al., 2015) e *C. hirtus* (DAOUDA et al., 2014).

Estudos com o β -cariofileno atestam seu potencial biológico, tais como: atividade antimicrobiana (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2009; GIL et al., 2016), atividade antinociceptiva (CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010); atividade anti-inflamatória (FERNANDES et al., 2007) ativação do sistema endocanabinoide (GERTSCH et al., 2008), efeitos no músculo liso intestinal de ratos (LEONHARDT et al., 2010), neuroproterora (VIVEROS-PAREDES et al., 2017) e anti-alodinia (SEGAT et al., 2017).

4.4.2 Atividades biológicas e capacidade antioxidante do óleo essencial

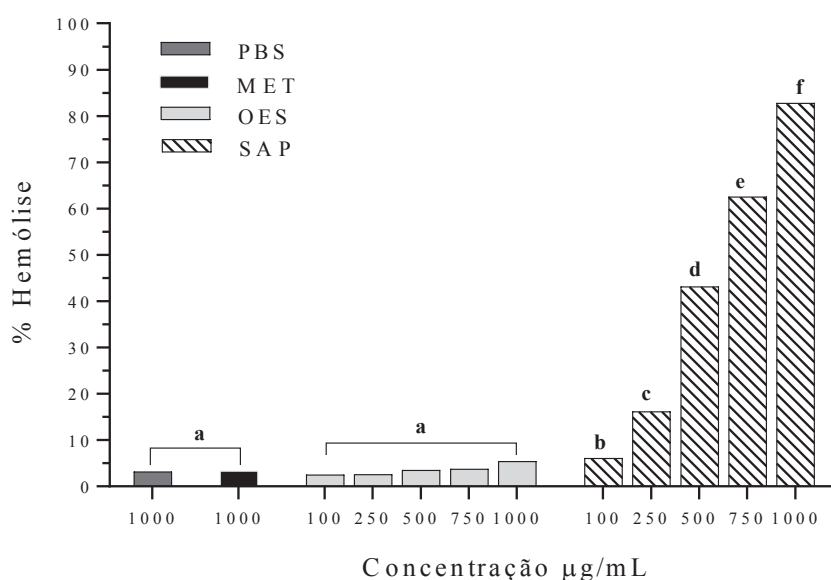
O ensaio com *Artemia salina*, fornece um *screening* do potencial citotóxico de extratos e óleos essenciais de plantas, podendo determinar seu potencial terapêutico e ser

utilizado para isolar compostos biologicamente ativos (SOLIS, 1993; PARRA et al. 2001). Várias espécies de *Croton* apresentaram toxicidade em ensaios com *Artemia salina*, como *Croton regelianus* e o monoterpenoide estragol, isolado do *Croton zehntneri* (TORRES et al., 2008; ANDRADE et al., 2015). Entretanto, o óleo essencial de *C. glandulosus* apresentou $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$, não demonstrando toxicidade aos náuplios de *A. salina*. Segundo a classificação de Nguta et al., (2011), quanto menor o CL_{50} maior a toxicidade da substância e CL_{50} maior que $1000 \mu\text{g/mL}$, não é representativo de toxicidade.

No ensaio com *A. salina* foi possível verificar apenas a propriedade tóxica preliminar do óleo, tendo em vista que, a toxicidade é verificada em testes farmacológicos, em doses elevadas (MCLAUGHLIN, 2008). Logo, o teste demonstrou que o óleo essencial de *C. glandulosus* não apresenta risco aos organismos aquáticos, por não gerar contaminação das águas superficiais e subterrâneas. Diferentemente, os agrotóxicos sintéticos, atingem o solo por drenagem, percolação, escoamento ou volatilização, afetando as fontes de águas e os seres vivos ali existentes (SILVA et al., 2009).

Por meio do ensaio de hemólise, não foi observada capacidade hemolítica (FIGURA 19) do óleo essencial de *C. glandulosus* quando comparado ao controle negativo, PBS, indicando que o óleo não é capaz de romper eritrócitos, nas concentrações testadas.

FIGURA 19 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. glandulosus*



FONTE: O autor (2020).

PBS: Controle negativo tampão fosfato; MET: Controle negativo metanólico; OES: Óleo essencial; SAP: Controle positivo Saponina. Resultados expressos em média aritmética. Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa a nível de $p < 0.05$ pelo teste de Tukey.

Estes resultados diferem de outras espécies de *Croton* (MEIRELES et al., 2016) que apresentaram toxicidade quando testados em eritrócitos, provavelmente devido a diferença de composição química do óleo essencial. Portanto, testes de toxicidade *in vivo* devem ser realizados, para fornecer maiores dados sobre a segurança na utilização do óleo essencial de *C. glandulosus*.

Como esperado, o padrão positivo, saponina, utilizado para fins de comparação, apresentou rompimento dose-resposta dos eritrócitos. Isso ocorre, devido à capacidade hemolítica das saponinas, que está relacionada com a interação das saponinas com os esteróis da membrana eritrocítica, que causam danos irreversíveis à bicamada lipídica, cujo resultado é o aumento da permeabilidade, ruptura celular e perda da hemoglobina (BAUMAN et al., 2000; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004).

Para uso agrícola, o óleo essencial de *C. glandulosus*, é promissor na aplicação em culturas, não representando risco à cadeia alimentar do ecossistema devido ao baixo tempo de meia-vida no solo. Já os agrotóxicos, ao atingir o solo e a água, de forma interligada, podem afetar níveis mais altos do sistema, como mamíferos e o próprio homem (PIGNATI et al., 2007; STEFFEN et al., 2011).

A capacidade de germinação (TABELA 8) das sementes de *Lactuca sativa* não foi afetada em nenhuma das concentrações, entretanto, o índice de germinação foi reduzido entre 21,57% e 26,72%, para as concentrações de 1%, 0,10% e 0,01%. Segundo Carvalho et al., (2015) a germinação é mais resistente à substâncias alelopáticas do que o crescimento das plântulas.

TABELA 8 - CAPACIDADE ALELOPÁTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. glandulosus*

Amostra	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	%G	IVG
Água destilada	30,51±5,13 ^b	25,34±5,60 ^c	100±0,57 ^a	4,08±1,15 ^b
Tween 1%	32,13±5,47 ^b	24,61±7,64 ^c	95±0,50 ^a	4,16±1,23 ^b
1%	24,31±8,16 ^a	20,10±8,69 ^b	95±0,50 ^a	3,01±0,68 ^a
0,10%	19,08±10,27 ^a	18,17±10,36 ^b	90±0,58 ^a	3,20±0,68 ^a
0,01%	28,50±9,99 ^b	25,07±9,90 ^c	92±0,58 ^a	2,99±0,83 ^a
0,001%	30,99±7,06 ^b	13,01±3,63 ^a	100±0,00 ^a	3,74±0,69 ^a

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Porcentagem de germinação (%G); Índice de velocidade de germinação (IVG). Os resultados estão expressos em média aritmética ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna, não representam diferença estatística a nível de significância $p < 0.05$ pelo teste de Scott Knott.

No teste de crescimento (TABELA 8), o hipocótilo foi inibido em 20,33% e 37,47% respectivamente, nas concentrações de 1% e 0,10% e o crescimento da radícula inibido em 20,68%, 28,30% e 48,66% respectivamente, nas concentrações de 1%, 0,10% e 0,001%. Os resultados demonstraram que o óleo influencia o crescimento das plântulas de forma mais

evidente do que a germinação das sementes, o que corrobora com dados encontrados na literatura para o estudo de alelopático de *Mimosa bimucronata* (JACOBI; FERREIRA, 1991) e *Eucalyptus urograndis* (CARVALHO et al., 2015).

Logo, a inibição das plântulas durante seu crescimento é um mecanismo mais efetivo de alelopatia do que a inibição da germinação (JACOBI; FERREIRA, 1991). A alelopatia é muito importante na competição e crescimento de muitas espécies, principalmente plantas de cultivo. Dessa forma, o óleo essencial e extratos de plantas, podem ser utilizados como herbicidas naturais, pois, alguns estudos têm demonstrado que os monoterpenos são inibidores potentes da mitose celular (SAHARKHIZ et al., 2008; CASIMIRO et al., 2017).

Estudos demonstram o potencial fitotóxico dos terpenos volatéis, que atuam na inibição da germinação de sementes e do alongamento da radícula, podendo-se dizer que esta propriedade alelopática dos terpenoides ocorre devido aos efeitos negativos na expansão celular, na síntese de DNA e proliferação celular, inibindo preferencialmente a mitose celular no meristema apical da raiz (NISHIDA et al., 2005; SAHARKHIZ et al., 2008; MANCINI et al., 2011).

Nishida et al. (2005) também observaram que alguns terpenos influenciam o crescimento da radícula, mais severamente do que o hipocótilo. Este fato está provavelmente relacionado às diferenças na forma de crescimento dos dois órgãos. O crescimento do hipocótilo depende do alongamento de cada célula, que já ocorreu no embrião dentro da semente, enquanto o crescimento radicular envolve tanto a proliferação, como o alongamento das células (POSPÍŠILOVÁ; OBROUCHEVA, 2000). Dessa forma, a composição predominante de terpenos no óleo essencial de *C. glandulosus*, podem indicar algumas vias de inibição das plântulas de *L. sativa*.

Além disso, neste estudo, não foi possível observar um efeito dose-resposta em relação à inibição do crescimento dessas plântulas. Porém, o mesmo comportamento foi observado em outros estudos como o de Sausen et al. (2009), que avaliou o crescimento de mudas de tomate submetidas a extratos de *Nepeta meyeri*. A pesquisa de Yun et al. (1993) com óleo essencial de *Artemisia princeps*, também não demonstrou efeito dose-resposta. O mecanismo para esse comportamento ainda não foi completamente elucidado, portanto, nosso grupo de pesquisa presumiu que a inibição pode estar associada à substâncias alelopáticas, que em uma concentração específica são capazes de desempenhar um papel de fitotoxicidade por meio do sinergismo e /ou antagonismo do compostos ali presentes. Dessa forma, um único composto pode afetar muitas funções biológicas, enquanto muitos podem comprometer a mesma via biológica (MALHEIROS; PERES 2001).

O estudo com o óleo essencial de *C. glandulosus*, resultou na presença de plântulas anormais, com raízes primárias atrofiadas e defeituosas, indicando fitotoxicidade, o mesmo fenômeno foi observado por outros autores em estudos de alelopatia (BORELLA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012, CARVALHO et al., 2015). Os parâmetros analisados, servem como base para estudos futuros acerca da aplicação do óleo essencial em grandes culturas, o que pode ser vantajosa devido às substâncias fitotóxicas, capazes de inibir o crescimento de plantas indesejáveis, apresentando baixo impacto ambiental devido à menor meia-vida das substâncias naturais (DUKE et al., 2000). Além disso, o desenvolvimento das plantas daninhas nos cultivos agrícolas causa perdas financeiras exigindo o uso de herbicidas, comprometendo as condições ambientais, agregando adicionalmente, maior custo ao manejo agrícola (BATISH et al., 2007).

Em relação à capacidade antioxidante, no ensaio de fosfomolibdênio o óleo de *Croton glandulosus* demonstrou melhor redução do complexo (TABELA 9) quando comparado com o padrão rutina (106,38%).

TABELA 9 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. glandulosus*

Amostra Óleo	Fosfomolibdênio			DPPH
	% AA/ Rutina ¹	% AA/ Ácido ascórbico ¹	% AA/ BHT ¹	CE ₅₀ µg /mL
	106,38±0.015	27,56±0.004	62,17±0.053	>1000

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Resultados expressos em média aritmética e desvio padrão. Letras minúsculas iguais não representam diferença estatística a nível de significância $p < 0.05$. ¹% AA/ Rutina; ácido ascórbico e BHT = % Atividade Antioxidante em relação à Rutina; ácido ascórbico e BHT.

O ensaio de fosfomolibdênio é uma técnica simples que avalia a capacidade do óleo em reduzir o Mo (VI) para o Mo (V), gerando a coloração verde em pH ácido (PRIETO et al., 1999). No entanto, na técnica de sequestro do radical DPPH os resultados não foram expressivos, sendo necessária uma concentração maior que 1000 µg/mL para reduzir 50% do DPPH• presente no meio reacional. O que corrobora com algumas espécies de *Croton*, como o *Croton zambesicus* que apresentou CE₅₀ de 4200 µg/mL (YAGI et al., 2016) e *Croton urucurana* CE₅₀ de 3210 µg / mL (SIMIONATTO et al., 2007).

Essa aparente discrepância nos resultados apresentados pode ser atribuído aos mecanismos envolvidos nas técnicas utilizadas e a hidro/lipofilicidade das substâncias antioxidantes presentes o óleo essencial. De acordo com Prieto et al. (1999) a técnica de formação do complexo fosfomolibdênio permite melhor a avaliação da capacidade antioxidante de componentes lipofílicos, o que pode justificar o melhor resultado obtido nesta técnica. Dessa forma, o potencial antioxidante do óleo de *Croton glandulosus* pode ser

explorado pela indústria farmacêutica e alimentícia, contribuindo com o desenvolvimento de alimentos funcionais ou conservantes de alimentos, como em alguns estudos realizados com óleo essencial de *Croton* (ROSSI et al., 2011; ROSSI et al., 2013).

4.5 ESTUDOS QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*

4.5.1 Teor de sólidos solúveis e rendimento do extrato bruto e frações

O extrato etanólico (extrato bruto) apresentou 5,84% de sólidos solúveis totais, ou seja, para obtenção de 58,41 g de extrato bruto, são necessários 1 Kg de planta seca. Os resultados dos rendimentos das frações (TABELA 10) foram calculados baseado em 109,08 g de extrato total, onde de 115,71 g de extrato bruto, foram retirados 6,6258 g para as análises biológicas.

TABELA 10 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES A PARTIR DO EXTRATO BRUTO DE *C. glandulosus*

Fração	Massa obtida em g	Rendimento em %
Hexânica	33,85	31,04
Clorofórmica	5,22	4,78
Acetato de Etila	3,15	2,89
Residual	43,49	39,87

FONTE: O autor (2020).

4.5.2 Pesquisa de grupos químicos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Observou-se na cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato bruto, a presença de bandas castanhas, que indicam a presença de compostos fenólicos e bandas verdes, que indicam a presença de taninos. Sob a luz UV (Ultravioleta), foi possível verificar a presença de bandas amarelas, indicativo de flavonoides.

As frações Clorofórmica (CLO), acetato de etila (FAC) e residual (RES), também demonstraram a presença de compostos fenólicos e flavonoides (Luz UV) (TABELA 11). O extrato hexânico (HEX), apresentou uma banda fortemente verde, indicando a presença de taninos.

TABELA 11 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE GRUPOS QUÍMICOS DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *C. glandulosus* EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Grupo químico	Fase Móvel	Revelador	EBR	HEX	CLO	FAC	RES
Esteroides/ Triterpenos	C ₇ H ₈ : C ₄ H ₈ O ₂ (93:7)	Vanilina Sulfúrica 1%	+	+	+	-	-
Flavonoides	C ₄ H ₈ O ₂ : CH ₂ O ₂ : H ₂ O (95:3:2)	Reativo de NEU	+	-	+	+	+
Polifenóis	C ₄ H ₈ O ₂ : CH ₂ O ₂ : H ₂ O (95:3:2)	Cloreto férrico	+	-	+	+	+
Taninos	C ₄ H ₈ O ₂ : CH ₂ O ₂ : H ₂ O (95:3:2)	Cloreto férrico	+	+	-	-	-
Alcaloides	CHCl ₃ :CH ₃ OH (95:5) c/ universo amônio	Dragendorff	-	-	-	-	-
Cumarinas	C ₇ H ₈ :C ₄ H ₈ O ₂ (80:20)	Reativo de NEU e NaOH 1N	+	+	+	-	-

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Símbolo + indicativo de reação positiva, símbolo – indicativo de reação negativa. Extrato bruto (EBR); Fração hexânica (HEX); Fração clorofórmica (CLO); Fração acetato de etila (FAC); Fração residual (RES). H₂O: Água destilada; C₇H₈: tolueno; C₄H₈O₂: acetato de etila; CH₂O₂: ácido fórmico; CHCl₃: clorofórmio; CH₃OH: metanol.

Nos ensaios para esteroides e triterpenos, observou-se a presença desses grupos químicos nos extratos EBR, HEX e CLO, pela visualização de cor verde claro. Não se observou a presença de esteroides e triterpenos nas frações FAC e RES. Foi observada a presença de cumarinas nos extratos EBR, HEX e CLO, por meio da formação de banda azul, visível sob luz UV. No entanto, no ensaio sistemático de fitoquímica preliminar do material vegetal, não foi possível verificar a presença desse grupo químico, o que pode ter ocorrido devido ao método de extração, bem como pelos solventes utilizados. A escolha do solvente é muito importante no processo de extração de compostos bioativos. Deve-se considerar a seletividade, custo e segurança. Além disso, solventes de polaridade próximo à polaridade do soluto, terão um melhor desempenho no processo de extração na investigação fitoquímica (ZHANG; LIN; YE, 2018). Isso ocorre pois os solventes e métodos de extração podem interferir tanto no rendimento dos extratos, quanto na extração de moléculas de interesse, bem como, nas propriedades biológicas que o extrato pode desempenhar (HAYOUNI et al., 2007).

Em relação ao método, a maceração é um processo simples, que possui como desvantagem uma baixa eficiência de extração, ao contrário da extração por equipamento de Soxhlet, que é um método automático de extração contínua, com alta eficiência de extração. Além disso, o tempo de extração utilizado para ensaio sistemático de fitoquímica preliminar, foi muito menor em relação ao tempo de extração no equipamento de Soxhlet, cujos extratos foram utilizados no ensaio de CCD. Isso ocorre devido ao tempo de duração da extração, que é considerado um ponto crítico no método, pois, a eficiência da extração aumenta conforme

aumenta o tempo de duração do procedimento, que sessa quando o soluto atinge um equilíbrio (ZHANG; LIN; YE, 2018).

Tanto no ensaio sistemático de fitoquímica preliminar do material vegetal, como nos extratos e frações obtidas pelo Soxhlet, não se observou a presença de alcaloides. Os resultados encontrados no teste de CCD do extrato bruto e frações, demonstram similaridade com o ensaio fitoquímico preliminar realizado com o material vegetal, o qual verificou-se a presença de compostos fenólicos, flavonoides, taninos, esteroides e triterpenos.

Os resultados encontrados corroboram com dados da literatura, que demonstraram a presença de compostos fitoquímicos em outras espécies de *Croton*, como *Croton sellowii* e *Croton urucurana* nas quais observou-se a presença de esteroides e triterpenos, além de alguns flavonoides em seus extratos (JUNIOR et al., 2006; DUTRA; VILLANOVA; SEVERI, 2016). O gênero *Croton* é rico em metabólitos secundários, como flavonoides e terpenos. Dentre os terpenoides mais predominantes, destacam-se os diterpenos, principalmente os do tipo clerodano, podendo ser encontrados em menores proporções, triterpenos pentacíclicos e esteroides (PUEBLA et al., 2002; LOPES et al., 2012; ABEGA et al., 2014). Várias atividades biológicas têm sido descritas para alguns terpenos, como leishmanicida, antimicobacteriano, anti-inflamatório, anti-alzheimer, atividade anti-proliferativa, entre outras atividades (LIMA et al., 2015; XU et al., 2015; ZHAO et al., 2016; YILMAZ; BOGA; TOPÇU, 2016; KAEMCHANTUEK et al., 2017).

Além dos terpenoides, os flavonoides são comumente encontrados nas espécies de *Croton*, como *Croton zambesicus*, *Croton schiedeianus*, *Croton gnaphalii* e *Croton campestris* (LENCINA et al., 2001; GUERRERO et al., 2002; DOS SANTOS 2005; BARRETO et al., 2013; FURLAN et al., 2015; COELHO et al., 2019). Os flavonoides são substâncias que possuem diversas atividades biológicas, como capacidade antimutagênica, antifúngica, leishmanicida, hepatoprotetora, antioxidante (BENTELDJOUNE et al., 2019; HE et al., 2019; OKUNO; MARUMOTO; MIYAZAWA, 2019; ROCHA et al., 2019; SOUZA-MOREIRA et al., 2019).

A presença de taninos nos extratos de *C. glandulosus* corroboram com estudos de outras espécies de *Croton*, que demonstraram a presença destes compostos, como os extratos de *Croton lobatus*, *Croton elegans*, *Croton roxburghii* e *Croton urucurana* (PANDA; BATISTA; DUTTA, 2010; KILANI et al., 2019; SANTOS SILVA et al., 2019; TOAQUIZA AGUAGALLO et al., 2019;). A presença de taninos nos extratos é importante, pois está relacionada à várias atividades biológicas, como anti-inflamatória, antifúngica, hepatoprotetora, antioxidante, cardioprotetora, antiviral, imuno-modulatória, anti-hiperalgésico, entre outros

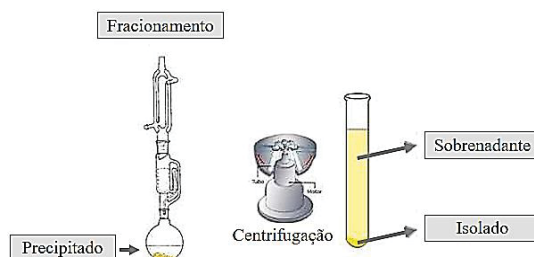
(KARAMACÍ, 2010; PANDA; BATISTA; DUTTA, 2010; KUMARI; JAIN, 2012; MOREIRA et al., 2013; SOBEH et al., 2018; TOAQUIZA AGUAGALLO et al., 2019).

Em relação à presença de Cumarinas, algumas espécies de *Croton* também demonstraram a presença destes componentes, como *Croton cajucara*, *Croton draco*, *Croton regelianus* e *Croton heliotropiifolius* (SETZER et al., 2007; MENEZES TORRES 2008; RODRIGUES et al., 2012; SILVA et al., 2017). Estes componentes possuem diversas atividades biológicas, como antioxidante, antitumoral, antifúngica, antinociceptiva, anti-inflamatória, antiangiogênica, entre outras (WEBER; STEFFEN; SIEGERS, 1998; LEAL et al., 2000; LEE et al., 2006; STEIN et al., 2006; KADHUM et al., 2011).

4.5.3 Isolamento e identificação de substâncias puras da fração acetato de etila

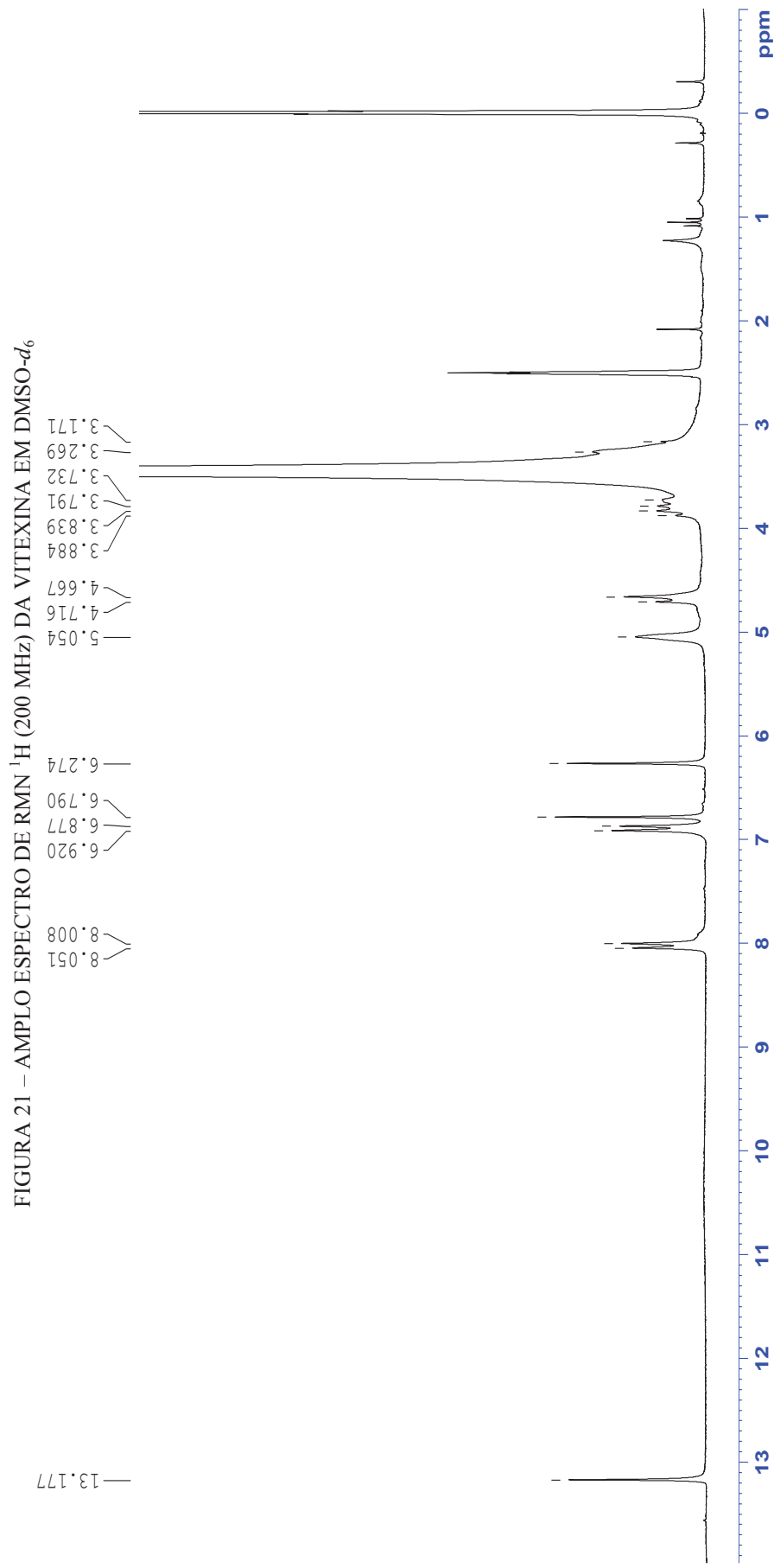
Durante o processo de fracionamento da fração acetato de etila, formou-se um precipitado no fundo do balão do Soxhlet, envolvido por uma goma de cor marrom. O precipitado foi ressolubilizado em metanol, com sucessivas lavagens e centrifugação (3.000 rpm/4 min.) para retirada da substância pura (FIGURA 20).

FIGURA 20 - PROCESSO DE ISOLAMENTO DO FLAVONOIDE



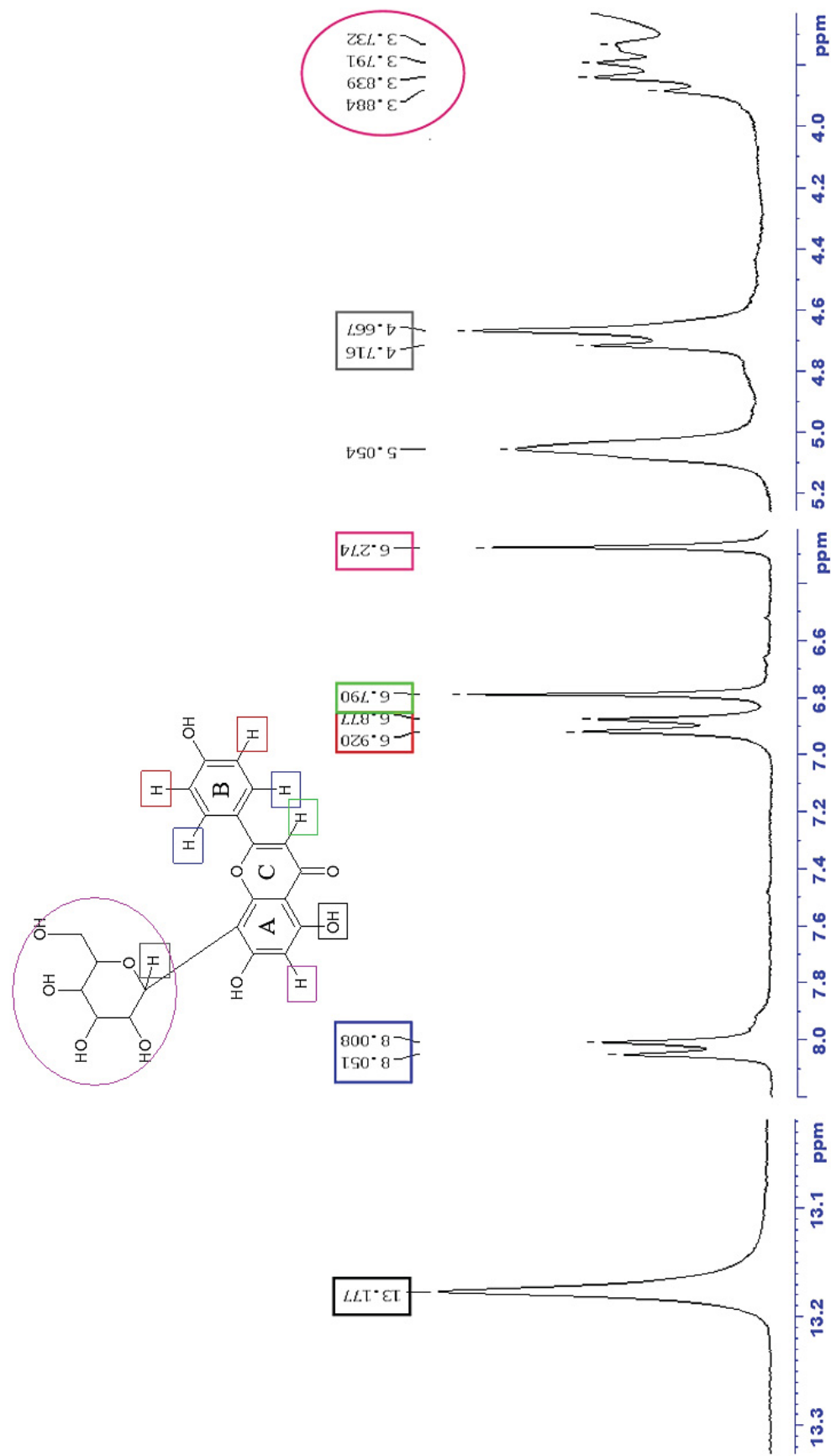
FONTE: O autor (2020).

Posteriormente, realizou-se a separação de substâncias com a fração acetato de etila, utilizando-se coluna cromatográfica gravimétrica, da qual obteve-se um pó amarelo e amorfo na subfração 85:15 (acetato de etila: metanol) da coluna. Os precipitados obtidos a partir do resíduo do balão e da subfração cromatográfica, foram submetidos à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para determinação de grupos químicos. Após a revelação com o reativo de NEU, observou-se a presença de banda amarela sob luz UV (Ultravioleta), indicativo da presença de flavonoides. Em visto disso, os precipitados foram submetidos ao espectrômetro de RMN ^1H e ^{13}C para identificação das estruturas químicas. A partir dos espectros de RMN verificou-se os isolados do resíduo do balão e da subfração acetato de etila, se tratavam da mesma substância química (FIGURA 21, 22 e 23).



FONTE: O autor (2020).
NOTA: $\text{DMSO}-d_6$: Dimetilsulfóxido deuterado.

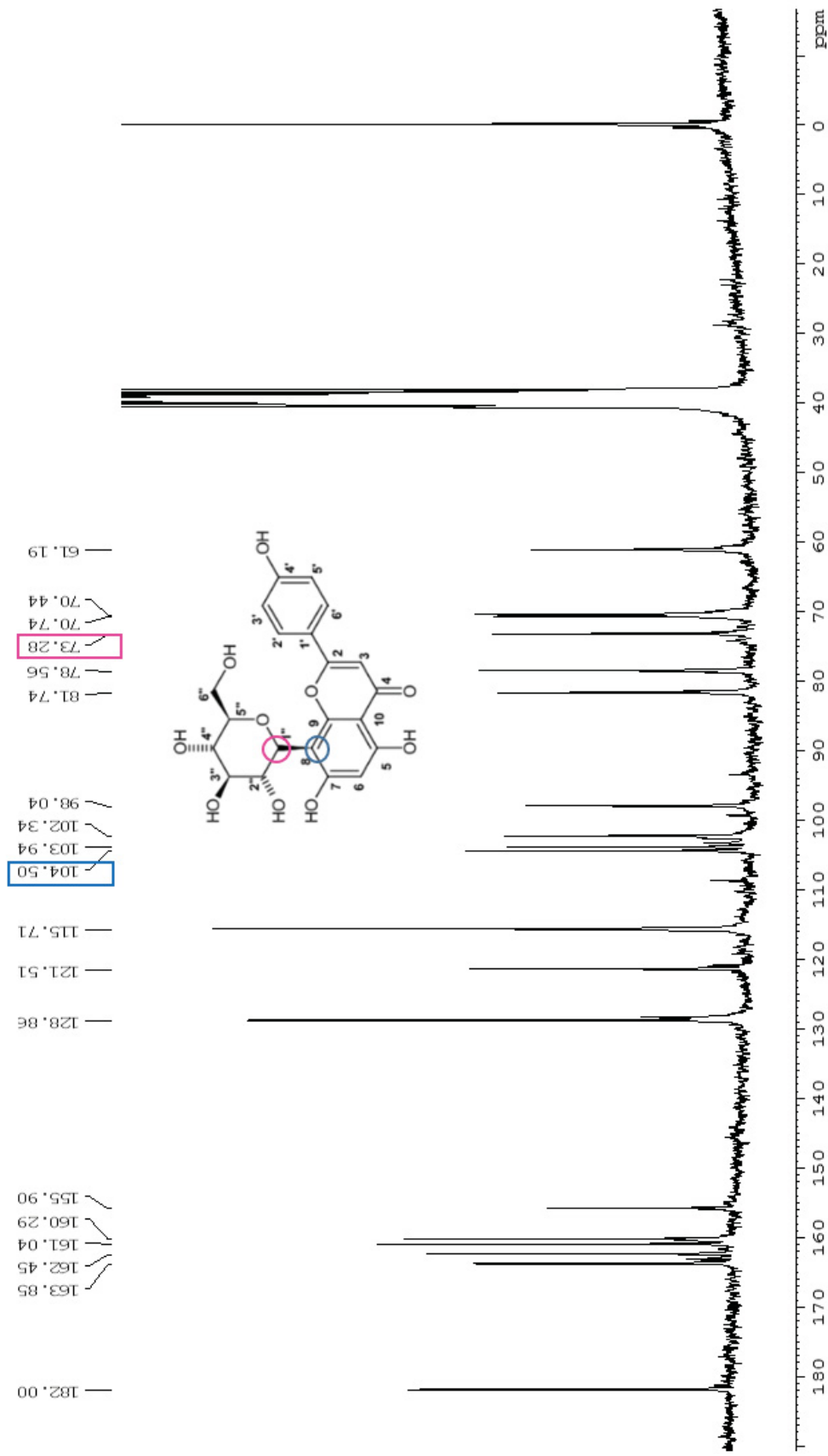
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN ^1H (200 MHz) DA VITEXINA EM $\text{DMSO}-d_6$ E SUA ESTRUTURA QUÍMICA



FONTE: O autor (2020).

NOTA: $\text{DMSO}-d_6$: Dimetilsulfóxido deuterado.

FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (200 MHz) DA VITEXINA EM $\text{DMSO}-d_6$ E SUA ESTRUTURA QUÍMICA



FONTE: O autor (2020)

NOTA: $\text{DMSO}-d_6$: Dimetilsulfóxido deuterado.

Na FIGURA 22 está apresentado o espectro de RMN de ^1H , no qual observou-se 2 dubletos em 8,03 ppm e 6,90 ppm, referentes ao acoplamento dos hidrogênios na posição 2 e 6 e acoplamentos dos hidrogênios na posição 3 e 5 do anel B da estrutura do flavonoide. O dubleto no deslocamento de 4,69 está relacionado ao hidrogênio do carbono anomérico do grupo glicosil.

Na FIGURA 23 está apresentado o espectro de RMN de ^{13}C , no qual observou-se o deslocamento em 104,5 que está relacionado à ligação do carbono 8 do anel A do flavonoide com o carbono anomérico do grupo glicosil, cujo deslocamento em 73,2 caracteriza do composto químico vitexina.

Na TABELA 12, realizou-se a comparação dos sinais do espectro da vitexina isolada da fração acetato de etila de *C. glandulosus*, com os dados da literatura. Os sinais do espectro de RMN ^1H em 4,69 na posição 1'', sugerem a presença de um grupo glicosil, na posição do carbono 8 do anel A, o que corrobora com o encontrado na literatura para a vitexina. Os demais sinais, indicam que este composto é uma flavona C-glicosilada, identificada como apigenina 8-C-glicosídeo ou Vitexina.

TABELA 12 - DADOS DE DESLOCAMENTO DO ESPECTRO DE ^1H RMN (200 MHz) DA VITEXINA EM $\text{DMSO}-d_6$ E DADOS DA LITERATURA

POSIÇÃO	^1H EXPERIMENTAL	^1H JUNG et al., 2014	^1H WEN et al., 2017
1	-	-	-
2	-	-	-
3	6,79 s	6,76 s	6,77 s
4	-	-	-
5	13,18 s	13,15 s	13,16 s
6	6,27 s	6,26 s	6,26 s
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
1'	-	-	-
2'	8,03 d (<i>J</i> : 8,6 Hz)	8,01 d (<i>J</i> : 8,7 Hz)	-
3'	6,90 d (<i>J</i> : 8,6 Hz)	6,88 d (<i>J</i> : 8,7 Hz)	6,90 d (<i>J</i> : 6,4 Hz)
4'	-	-	-
5'	6,90 d (<i>J</i> : 8,6 Hz)	6,88 d (<i>J</i> : 8,7 Hz)	6,90 d (<i>J</i> : 6,4 Hz)
6'	8,03 d (<i>J</i> : 8,6 Hz)	8,01 d (<i>J</i> : 8,7 Hz)	-
1''	4,69 d (<i>J</i> : 9,9 Hz)	4,69 d (<i>J</i> : 9,8 Hz)	4,69 d (<i>J</i> : 9,9 Hz)
2''	-	-	-
3''	-	-	-
4''	-	-	-
5''	-	-	-
6''	-	-	-

FONTE: O autor (2020).

Para o espectro de RMN de ^{13}C , a identificação da vitexina foi confirmada por meio de dados de deslocamento no espectro, que foram comparados com a literatura, conforme demonstrado na TABELA 13.

TABELA 13 - DADOS DE DESLOCAMENTO DO ESPECTRO DE ^{13}C RMN (200 MHz) DA VITEXINA EM $\text{DMSO}-d_6$ E DADOS DA LITERATURA

POSIÇÃO	^{13}C	^{13}C	^{13}C
	EXPERIMENTAL	JUNG et al., 2015	WEN et al., 2017
1	-	-	-
2	163,8	164,0	163,7
3	102,3	102,5	102,4
4	182,0	182,2	181,7
5	161,0	160,5	161,0
6	98,0	98,2	98,2
7	162,4	162,7	162,7
8	104,5	104,1	104,7
9	155,9	156,1	156,5
10	103,9	104,7	104,1
1'	121,5	121,7	121,5
2'	128,9	129,0	129,6
3'	115,7	115,9	115,7
4'	160,3	161,2	160,3
5'	115,7	115,9	115,7
6'	128,9	129,0	128,6
1''	73,3	78,7	73,3
2''	70,7	73,5	70,8
3''	78,5	70,9	78,5
4''	70,4	70,6	70,4
5''	81,7	81,7	81,7
6''	61,2	61,4	61,1

FONTE: O autor (2020).

Após a identificação, estimou-se o teor da vitexina, nos extratos EBR, CLO, FAC e RES (TABELA 14). Os dados obtidos demonstraram que a fração FAC e o extrato EBR, apresentaram, o maior teor do flavonoide, 3,50% e 1,67%, respectivamente; seguido da fração CLO (0,59%), e em menor proporção na fração RES (0,13%).

TABELA 14 - TEOR DE VITEXINA NAS FRAÇÕES DE *C. glandulosus*

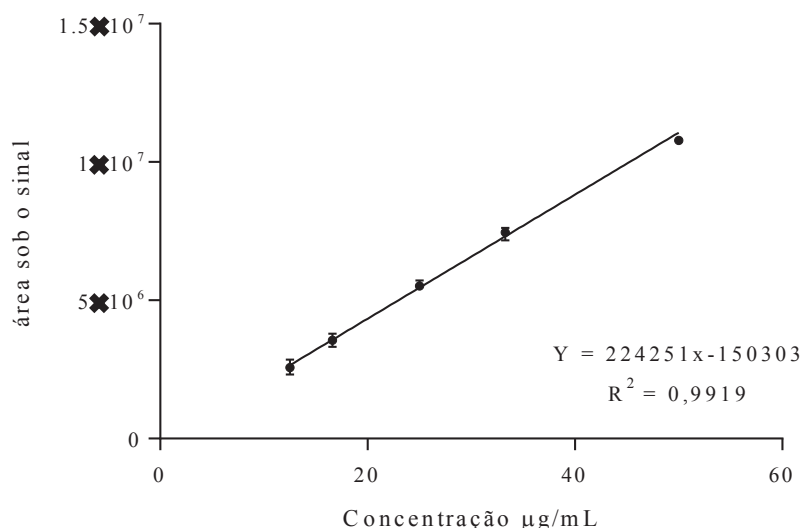
Amostra	Área sob o sinal	Tempo de retenção min.	Concentração $\mu\text{g}/\text{mg}$
EBR	3595494	21,6425	16,70
CLO	1172312	21,6842	5,90
FAC	7710067	21,7158	35,05
RES	152008	21,6258	1,35

FONTE: O autor (2020).

NOTA: EBR: Extrato bruto; HEX: Fração hexânica; CLO: Fração clorofôrmica; FAC: Fração acetato de etila, RES: Fração residual.

Os resultados foram calculados por meio da equação da reta obtida da curva analítica construída por análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – UV (CLAE-UV), na qual utilizou-se padrão de Vitexina (Aldrich 99% de pureza) (FIGURA 24).

FIGURA 24 - GRÁFICO DA CURVA ANALÍTICA DE VITEXINA E EQUAÇÃO DA RETA



FONTE: O autor (2020).

Os resultados demonstram que o extrato bruto e a fração acetato de etila, possuem teor considerável de vitexina, o que pode ser explorado nas atividades biológicas e farmacológicas, tendo em vista que, a vitexina é um flavonoide reconhecido por seu potencial antioxidante e atividades farmacológicas como antinociceptiva (ÖZKAY; CAN, 2013), anti-isquêmica (DONG et al., 2011; LIU et al., 2018), anti-asmática (VENTURINI et al., 2018), antitumoral, antiinflamatório, efeitos anti-hiperalgésico e neuroprotetores (HE et al., 2016).

A Vitexina apresentou alto potencial antioxidante na captura do radical DPPH e do cátion radical ABTS. Em outros estudos, a Vitexina atenuou significativamente a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), em modelos experimentais com células de HepG2, expostas ao peróxido de hidrogênio, modulando a atividade e expressão de enzimas antioxidantes endógenas, implicando seu potencial na redução do estresse oxidativo e na manutenção da homeostase redox celular (KHOLE et al., 2016).

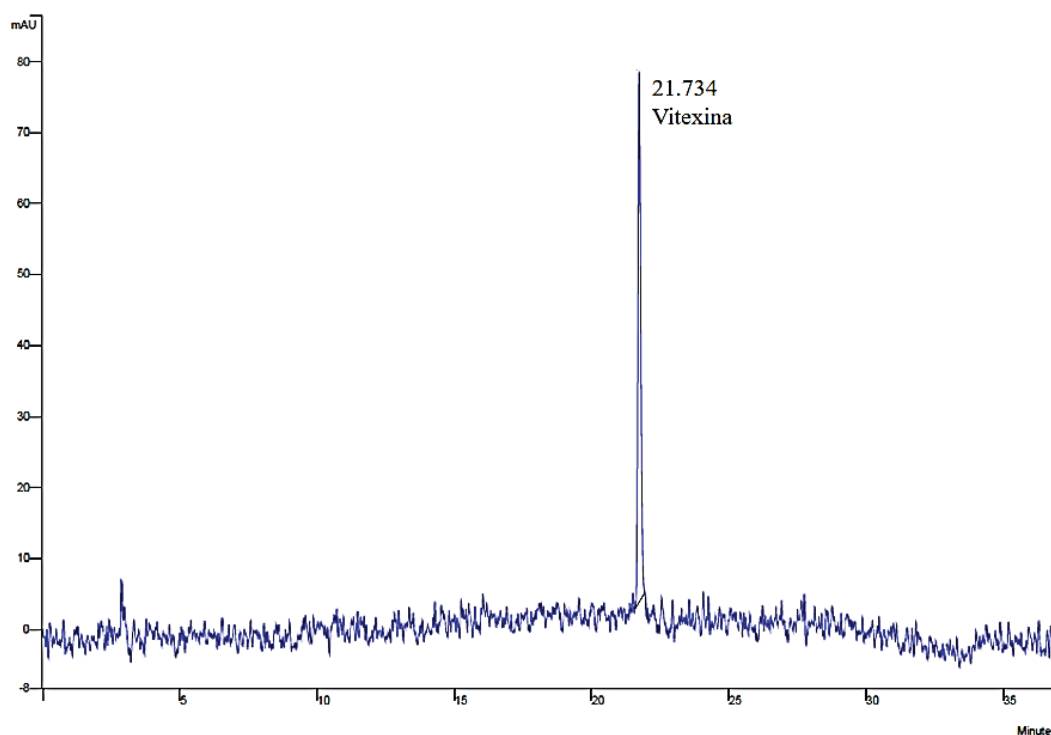
A vitexina é relatada pela primeira vez na espécie de *C. glandulosus*. Este flavonoide, também é encontrado em grandes quantidades em flores de *Trollius chinensis* (CHEN et al., 2017) e folhas de *Ficus deltoidea* (CHOO et al., 2012); e em outras espécies do gênero *Croton*, como folhas de *Croton zambesicus* (WAGNER; HORHAMMER; KIRALY, 1970), *Croton cajucara* (NASCIMENTO et al., 2017), *Croton tonkinensis* (GIANG; LEE;

SON, 2004), *Croton lechleri* (ALONSO-CASTRO et al. 2012) e partes aéreas de *Croton lobatus* (LAGNIKA et al., 2009).

4.5.4 Fingerprint dos extratos e frações por CLAE-UV

Por meio de análise cromatográfica por CLAE-UV, verificou-se a presença de picos de vitexina no extrato bruto e frações de *C. glandulosus*, quando comparados ao pico do padrão Vitexina (Aldrich 99% de pureza) que apresentou tempo de retenção em 21.734 no cromatograma (FIGURA 25).

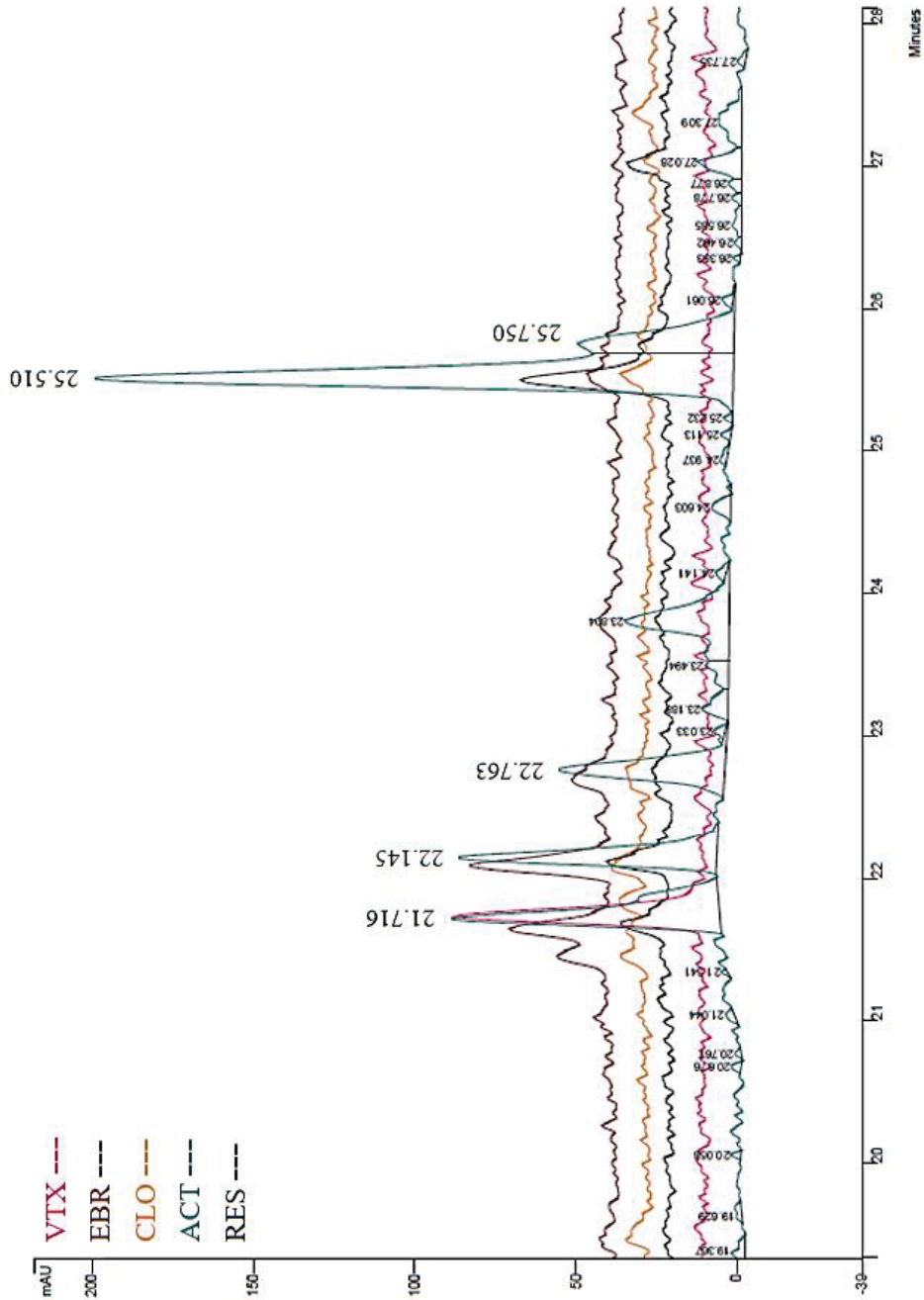
FIGURA 25 - ESPECTRO DE CLAE-UV DA VITEXINA



FONTE: O autor (2020).

O fingerprint do extrato e frações, demonstra a presença de picos intensos e característicos de vitexina, no extrato EBR e fração FAC, e em menor intensidade nas frações CLO e RES. Entretanto, o cromatograma demonstra que a vitexina não é o composto majoritário nesta espécie (FIGURA 26).

FIGURA 26 - CROMATOGRAMA GERAL DO PADRÃO VITEXINA EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*



FONTE: O autor (2020).

NOTA: VTX: Vitexina; EBR: Extrato bruto; CLO: Fração Clorofórmica; ACT: Fração acetato de etila; RES: Fração residual.

A fração FAC, apresentou maior intensidade do pico de vitexina, e consequentemente maior teor da substância (FIGURA 27). Este resultado era esperado, tendo em vista os solventes utilizados na extração, como acetato de etila, que devido sua polaridade, leva à extração de flavonoides e flavonoides glicosilados. Alguns estudos demonstraram que utilização do solvente acetato de etila, levou à separação de vitexina e isovitexina de *Croton tonkinensis* (GIANG; LEE; SON, 2004), e identificação de outros flavonoides em espécies do gênero *Croton*, como o estudo de Nardi et al. (2007) com *Croton celtidifolius* Bailon e o estudo de Aderogba et al. (2011) com *Croton zambesicus*.

FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS INDIVIDUAIS DO PADRÃO VITEXINA EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*

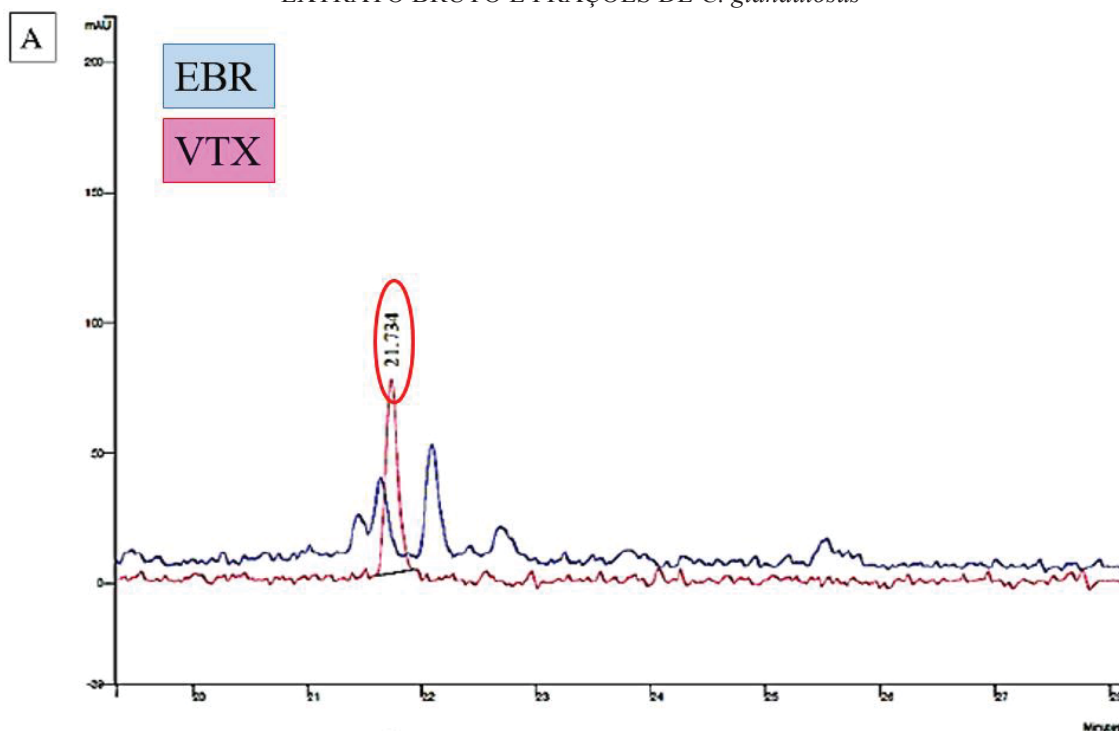


FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS INDIVIDUAIS DO PADRÃO VITEXINA EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*

(continua)

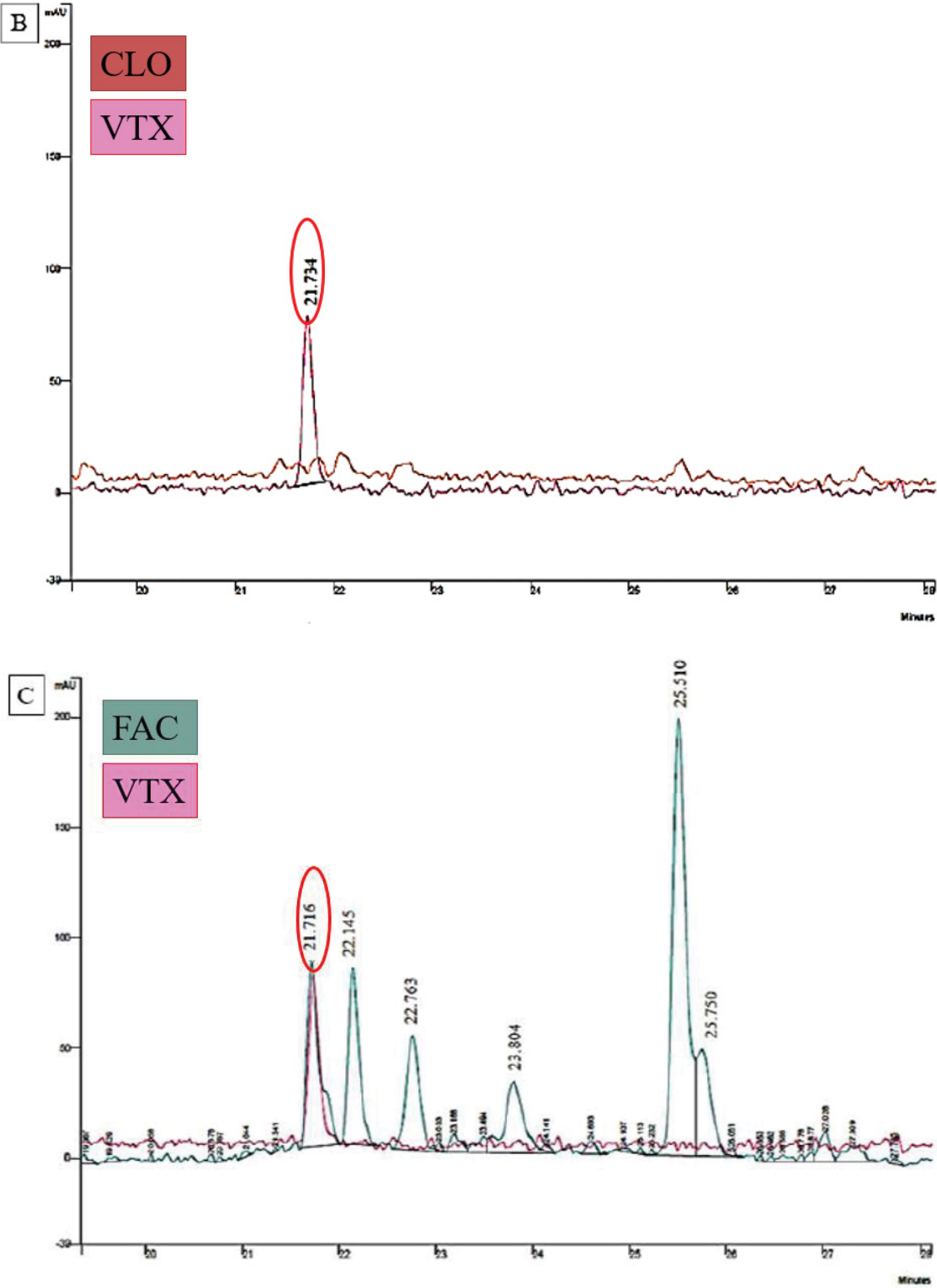
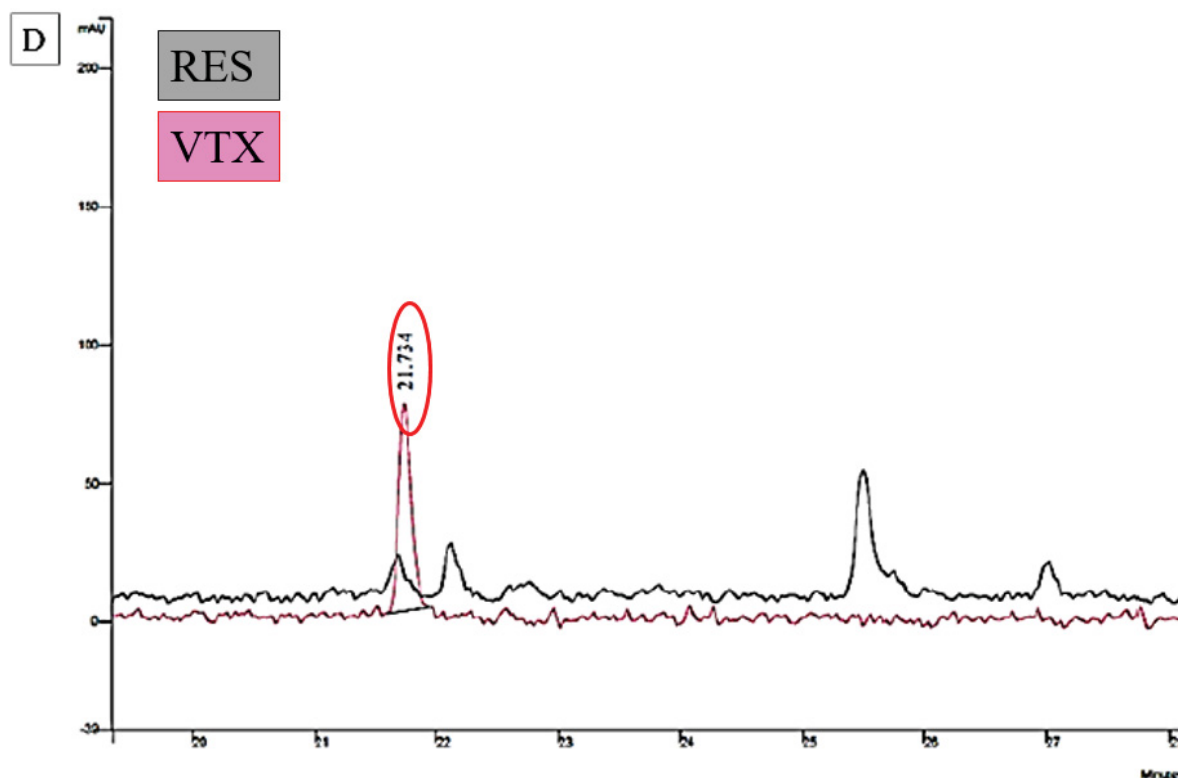


FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS INDIVIDUAIS DO PADRÃO VITEXINA EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*

(conclusão)

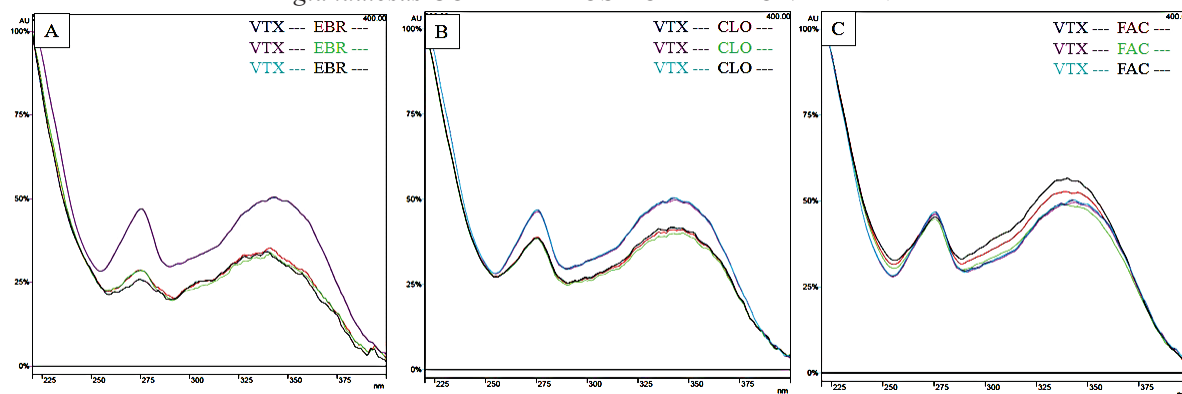


FONTE: O autor (2020).

NOTA: A: EBR (Extrato bruto); B: CLO (Fração clorofórmio); C: FAC (Fração acetato de etila); D: RES (Fração residual).

As bandas observadas em UV, do extrato EBR e frações FAC e CLO, foram confrontadas com as bandas do padrão Vitexina (FIGURA 28 e 29), demonstrando similaridade de 0,9999 (TABELA 15). Além disso, as bandas UV também apresentam similaridade com as bandas de UV descritas no livro de Mabry et al. (2012), o qual demonstra máximos de absorção entre 270 e 336 nm para o composto vitexina. As bandas de UV do flavonoide encontrado no extrato e frações, também corroboram com bandas de UV demonstradas em outros estudos científicos (ZHANG et al., 2005; WANG et al., 2012).

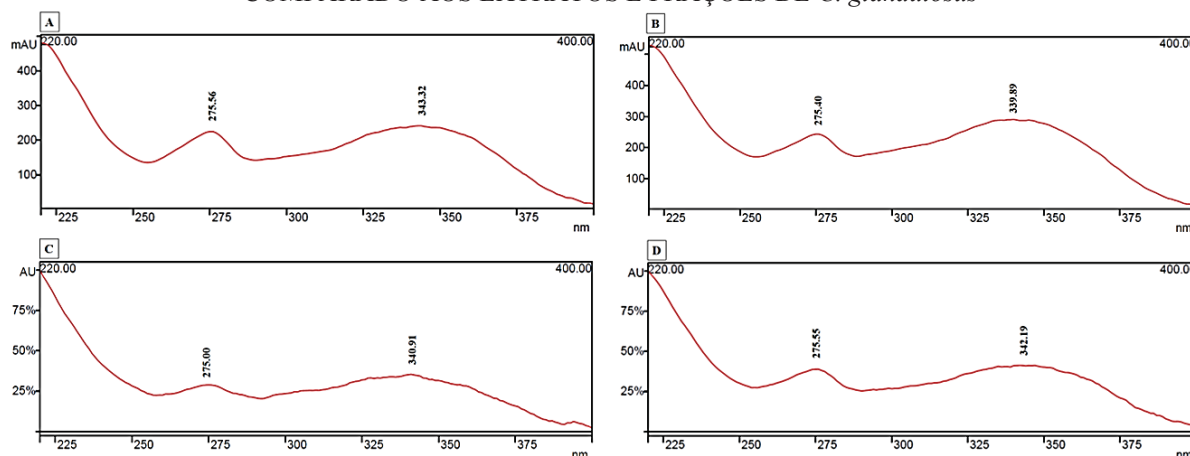
FIGURA 28 - PICOS DE ABSORBÂNCIAS EM CLAE-UV DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *C. glandulosus* COMPARADOS AO PADRÃO VITEXINA



FONTES: O autor (2020).

NOTA: A: Extrato bruto; B: Fração clorofórmio; C: Fração acetato de etila.

FIGURA 29 - COMPRIMENTO DE ONDA DOS PICOS DE ABSORBÂNCIAS DO PADRÃO VITEXINA COMPARADO AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*



FONTES: O autor (2020).

NOTA: A: Vitexina; B: Extrato bruto; C: Fração clorofórmio; D: Fração acetato de etila.

Na análise de CLAE-UV, observou-se a presença do pico de vitexina no extrato bruto e frações, entre 21,642 e 21,728 min. Apesar das análises de CLAE-UV, a presença da vitexina nos extratos foi confirmada por meio do teste de RMN ^1H e ^{13}C .

TABELA 15 - TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORBÂNCIAS DA VITEXINA E PICOS NO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*.

Amostra	R_t min.	λ_{\min} nm	λ_{\max} nm	Similaridade
VTX	21,732	275,56	343,32	---
EBR	21,642	275,55	342,19	0,9999
CLO	21,682	275,00	340,91	0,9999
FAC	21,728	275,40	339,89	0,9999
(Mabry et al. 2012)	-	270,00	336,00	-

FONTES: O autor (2020).

NOTA: R_t min: Tempo de retenção em minutos. λ_{\min} : Lâmbda mínimo em nm. λ_{\max} : Lâmbda máximo em nm.

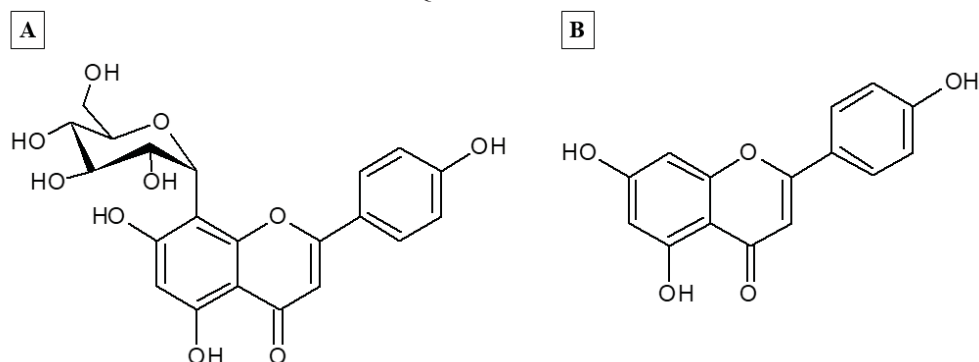
O fingerprint do extrato bruto (EBR) e frações FAC e RES (FIGURA 27), demonstraram a presença de outros picos, na região do ultravioleta, característicos de compostos flavonoides, o que corrobora com os resultados do ensaio fitoquímico preliminar e da análise de grupos químicos por CCD, nos quais verificou-se a presença destes compostos. É possível que alguns picos observados nos cromatogramas do extrato e frações, sejam pertencentes à compostos oriundos da rota metabólica da vitexina, como a apigenina e isovitexina, por exemplo.

Os flavonoides são sintetizados nas plantas, pela via fenilpropanoide, a qual converte a L-fenilalanina em 4-cumaril-CoA, gerando intermediários para a síntese de diversos flavonoides (MARIN et al., 2017). A naringenina (flavanona) é sintetizada a partir da tirosina, por ação de várias enzimas, e a partir da naringenina, é sintetizada a apigenina pela ação da flavona sintase (LEE et al., 2015). A vitexina (flavona), por sua vez, é formada após a glicosilação do anel, no carbono C-8, catalisado pela C-glicosiltransferase, que transfere uma molécula de glicose para a flavanona (apigenina) após oxidação. Porém, se a glicosilação ocorrer no carbono C-6, ocorre a síntese da isovitexina, isômero da vitexina (KERSCHER; FRANZ, 1987; ABDULLAH; CHUA; RAHMAT, 2017).

Alguns estudos demonstraram a presença de vitexina em seus extratos, comumente acompanhada de isovitexina, como na composição dos extratos de *Croton zambesicus* (MOHAMED et al., 2009; ADERIGBA et al., 2011), *Croton lobatus* (LAGNIKA et al., 2009), *Croton cajucara* (NASCIMENTO et al., 2017) e *Phyllostachys edulis* (XIE et al., 2013). Como o precursor da vitexina é a apigenina, é possível que a apigenina esteja presente no extrato, como observado no estudo do extrato de *Origanum sipyleum* (OZKAN et al., 2007).

É necessário frisar que em análises por CLAE-UV, a apigenina pode apresentar espectros semelhantes ao da vitexina. Isso ocorre devido aos dois compostos diferirem entre si, pela presença de um grupo glicosídeo, ligado ao carbono 8 da estrutura da vitexina. Já a apigenina, não possui a presença do glicosídeo, sendo considerada uma aglicona conforme demonstrado na FIGURA 30.

FIGURA 30 - ESTRUTURA QUÍMICA DA VITEXINA E APIGENINA



FONTE: O autor (2020).

NOTA: A: Estrutura química da vitexina; B: estrutura química da apigenina.

Os flavonoides de origem natural, em especial os glicosilados, encontram-se entre os polifenóis mais abundantes nas plantas. Entre os flavonoides glicosilados, os C-glicósídeos, como vitexina, isoorientina, orientina, isovitexina e seus derivados, são mais frequentemente encontrados do que os demais flavonoides (XIAO et al., 2014; XIAO et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que a glicosilação em compostos bioativos, pode melhorar suas propriedades fisiológicas, farmacológicas, seletividade, estabilidade e solubilidade. Entretanto, as moléculas c-glicosiladas, apresentam-se mais estáveis do que as moléculas o-glicosiladas, apresentando alta resistência química e à hidrólise enzimática (ABDULLAH; CHUA; RAHMAT, 2017). Consequentemente, os flavonoides c-glicosilados do que os o-glicosilados, apresentam melhor potencial terapêutico, atuando como substâncias antitumorais, antioxidantes, hepatoprotetoras, antivirais, antibacterianas, antifúngicas, antiglicêmicas, antiplaquetárias, anti-inflamatórias, entre outras (XIAO et al., 2016).

4.6 ESTUDOS BIOLÓGICOS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*

4.6.1 Avaliação da toxicidade preliminar dos extratos e frações

Anterior aos estudos farmacológicos, realizou-se estudos preliminares do potencial toxicológico da espécie. Verificou-se que os extratos e frações de *C. glandulosus* não apresentaram letalidade para os náuplios de *Artemia salina* (TABELA 16), pois os valores de CL_{50} foram superiores à 1000 $\mu\text{g/mL}$.

TABELA 16 - ENSAIO DE TOXICIDADE EM *Artemia salina*, DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*

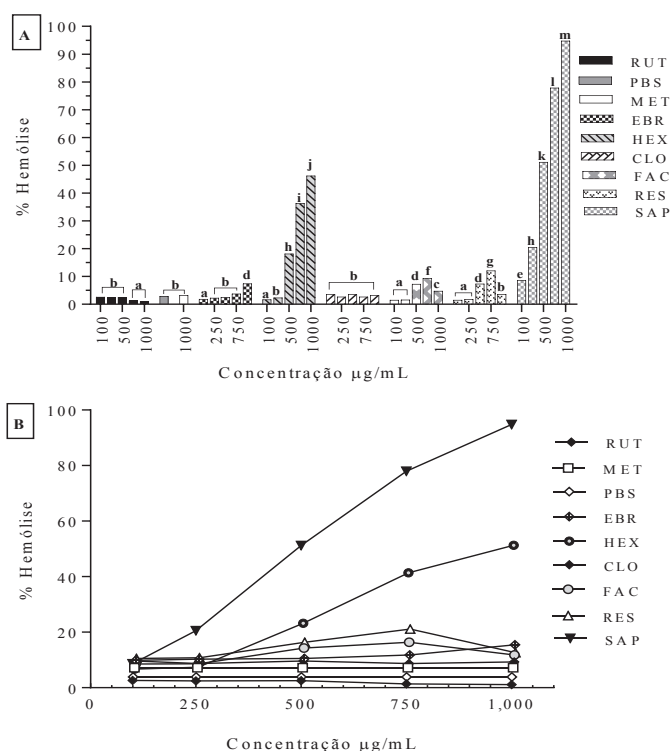
AMOSTRA	CL ₅₀	AMOSTRA	CL ₅₀
EBR	> 1000 µg/ mL	CLO	> 1000 µg/ mL
HEX	> 1000 µg/ mL	FAC	> 1000 µg/ mL
RES	> 1000 µg/ mL	QND	118,38 µg/ mL

FONTE: O autor (2020).

NOTA: EBR: Extrato Bruto; HEX: Fração Hexânica; RES: Fração Residual; CLO: Fração clorofórmica; FAC: Fração acetato de etila; QND: Quinidina. CL₅₀: Concentração letal para 50 %.

Conforme descrito anteriormente no item 4.4.2 no ensaio de *A. salina* com o óleo essencial, extratos com CL₅₀ maior que 1000 µg/ mL, não representam toxicidade (NGUTA et al.; 2011). Entretanto, estudos toxicológicos *in vivo* são necessários para atestar sua segurança para uso terapêutico.

O teste de capacidade hemolítica do extrato e frações, também foi avaliado como estudo preliminar de toxicidade. Os resultados estão apresentados na FIGURA 31.

FIGURA 31 - AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Gráfico de barras demonstrando a % de hemólise e diferença estatística a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si. B: Gráfico em linhas demonstrando a resposta da % de hemólise em relação à concentração das amostras. PBS: Controle Tampão Fosfato; MET: Controle metanol; EBR: Extrato Bruto; HEX: Fração Hexânica; CLO: Fração Clorofórmica; FAC: Fração Acetato de Etila; RES: Fração Residual; SAP: Controle positivo Saponina.

No teste de capacidade hemolítica, utilizou-se Triton 0,1% como controle 100% hemolítico. Para fins de comparação entre os extratos, utilizou-se o padrão saponina que atingiu 94,81% de capacidade hemolítica, na concentração de 1000 µg/mL. Em relação às amostras testadas, verificou-se que a fração HEX atingiu a maior porcentagem hemolítica entre os extratos (46,25%).

Apesar do efeito hemolítico em altas concentrações de HEX, para se confirmar a natureza tóxica de qualquer produto vegetal, é preciso considerar vários fatores que possam alterar seu perfil químico, incluindo o estágio de crescimento, maturidade da planta, condições de armazenamento do produto (recém-colhidas ou armazenadas por muito tempo), variação sazonal na abundância relativa de fitoquímicos, partes específicas das plantas (como folhas, raízes, cascas, flores, sementes, etc.) que foram utilizadas, pois geralmente algumas cascas e frutos, podem conter alcaloides, taninos ou outros compostos tóxicos (TÉDONG, et al., 2007).

Os taninos são compostos que podem desempenhar ação antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, entre outras atividades biológicas. No entanto, estes compostos podem atuar de maneiras diferentes, dependendo do tipo de tanino e também, de sua concentração. Em baixas concentrações por exemplo, os taninos podem prevenir danos ao DNA, enquanto que em altas concentrações podem desempenhar efeitos tóxicos. Em relação ao tipo de taninos, o ácido tânico apresenta efeito hemolítico, enquanto que o ácido gálico e ácido elágico, não possuem efeito significativo (THOMAS; PECK, 1948; FEDELI et al., 2004; ABED et al., 2013).

No ensaio fitoquímico preliminar observou-se a presença qualitativa de taninos na fração HEX. Levando-se em consideração o efeito hemolítico dessa fração, com comportamento dose-resposta, podemos sugerir a presença de taninos com capacidade hemolítica estejam presentes em altas concentrações, ou que tenham menor influência antagonista de outros componentes químicos da fração. Portanto, estudos futuros mais aprofundados são necessários para o esclarecimento deste mecanismo. Apesar do comportamento hemolítico evidenciado em altas concentrações de HEX, pode-se aplicar a fração HEX no estudo de outros testes biológicos e de capacidade antioxidante, quando em baixas concentrações.

Os demais extratos de *C. glandulosus*, apresentaram capacidade hemolítica abaixo de 15%. O extrato EBR, apresentou comportamento dose-resposta, cujo aumento da concentração do extrato, levou ao aumento da capacidade hemolítica. A fração CLO, não demonstrou alteração da capacidade hemolítica, na faixa de 100 a 1000 µg/mL. Já as frações

FAC e RES, apresentaram comportamento dose-resposta até a concentração de 750 µg/mL (9,39% e 12,09%, respectivamente), porém, na concentração de 1000 µg/mL, ambas as frações demonstraram redução da capacidade hemolítica (3,64% e 4,81%, respectivamente).

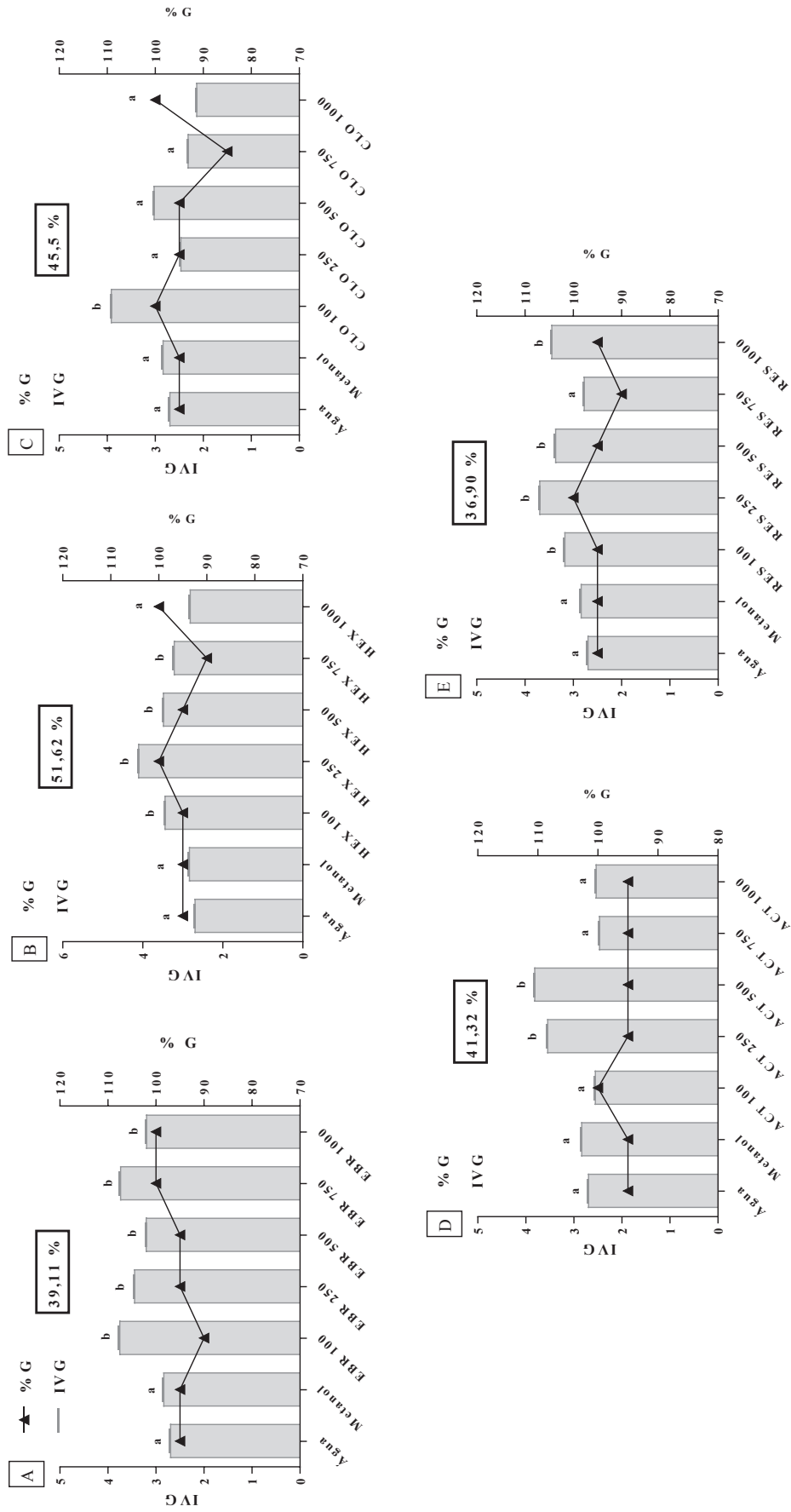
O extrato EBR, e frações HEX, FAC e RES, demonstraram capacidade hemolítica, estatisticamente inferior aos controles negativos (PBS e Metanol), nas menores concentrações (100-250 µg/mL). Para fins de comparação, devido a presença de compostos antioxidantes nos extratos, previamente estudados neste trabalho, utilizou-se um padrão fitoquímico, rutina (flavonoide), para verificar o seu comportamento mediante ao teste hemolítico.

Os resultados obtidos demonstraram uma redução da porcentagem de capacidade hemolítica da rutina, nas concentrações de 750 e 1000 µg/mL, quando comparada ao controle PBS. Em vista disso, a baixa capacidade hemolítica do extrato e frações nas concentrações de 100 e 250 µg/mL, pode estar relacionada à presença de flavonoides, que atuam como antioxidantes naturais, prevenindo o rompimento de eritrócitos.

A presença de antioxidantes no extrato e frações, como os compostos fenólicos e flavonoides, estabilizam a membrana eritrocítica, capturando radicais livres, consequentemente prevenindo a hemólise (AHMED et al., 2019). Vários estudos demonstraram a capacidade anti-hemolítica de flavonoides e extratos com potencial antioxidante, quando submetidos ao ensaio de hemólise, sendo que a ação hemolítica e anti-hemolítica estão relacionadas à concentração dos flavonoides. Pois estes podem atuar como antioxidantes ou pró-oxidantes, dependendo da mistura e ação sinérgica de outros compostos, bem como, da concentração em que estão presentes (KITAGAWA; SAKAMOTO; TANO, 2004; ASGARY; NADERI; ASKARI, 2005; RAMAN et al., 2016; EREN-GUZELGUN; INCE; GURER-ORHAN, 2018; AHMED et al., 2019).

No teste de alelopatia, os resultados da porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG), estão apresentados na FIGURA 32. Não observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação à porcentagem de germinação (%G), em nenhuma das amostras testadas.

FIGURA 32 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* TRATADA COM OS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*.



FONTE: O autor (2020)

NOTA: A: Extrato Bruto; B: Fração hexânica; C: Fração Clorofórmica; D: Fração Acetato de Etila; E: Fração Residual. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística a nível de 5% de significância para o teste de IVG..

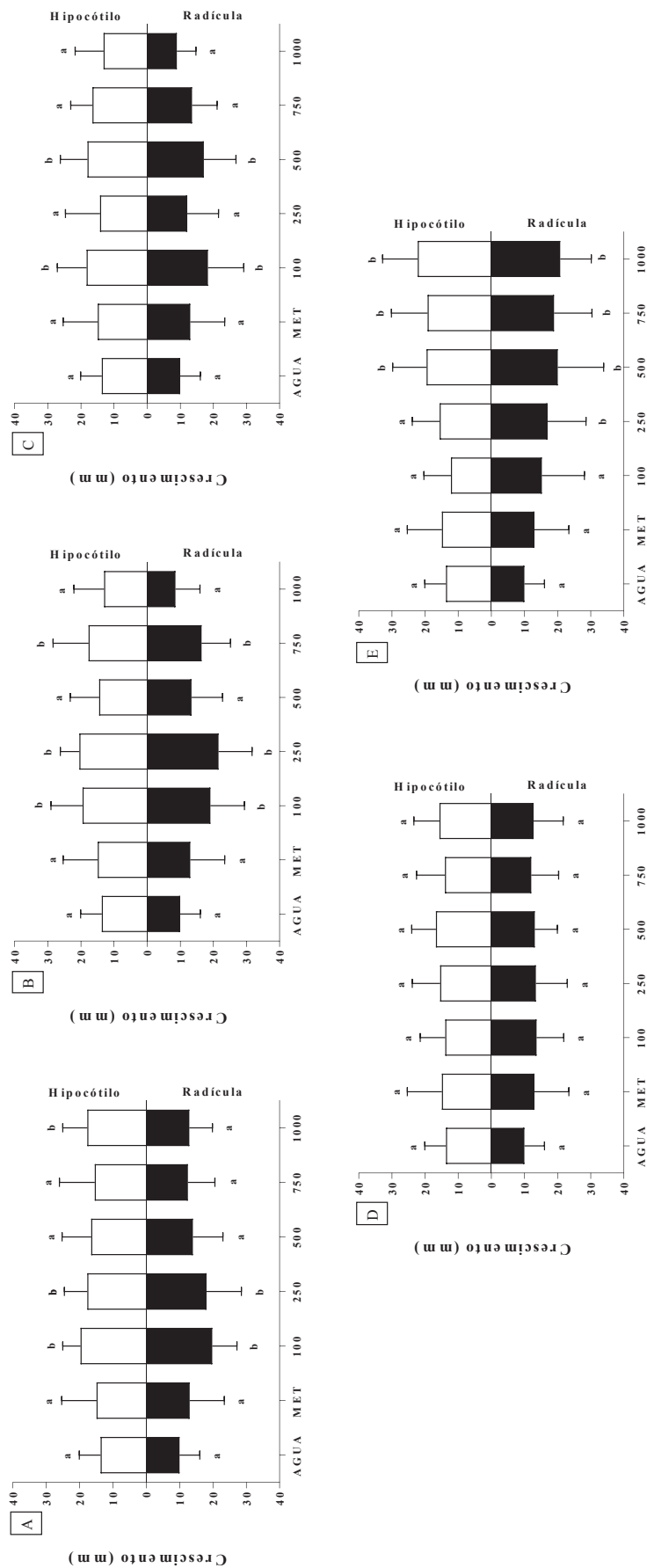
Em relação ao IVG, o extrato EBR, demonstrou aumento de 39,11%, em todas as concentrações, em relação ao controle (água destilada). A fração HEX, demonstrou aumento do IVG de 51,62% em relação à água, nas concentrações de 100 a 750 µg/mL. Já a fração CLO, apresentou aumento do IVG em 45,01%, apenas na concentração de 100 µg/mL. A fração FAC, apresentou aumento do IVG nas concentrações de 250 e 500 µg/mL, de até 41,32%. A fração RES, apresentou comportamento não-dose dependente, sendo que houve aumento do IVG de 36,90%, em relação à água, nas concentrações de 100 a 500, e na concentração de 1000 µg/mL.

Estudos demonstram que o efeito dos extratos sobre a germinação é menor quando comparado ao desenvolvimento da plântula, pois o processo germinativo utiliza reservas energéticas das próprias sementes. Entretanto, as frações demonstram estímulo no índice de velocidade de germinação, sendo que algumas alterações no padrão de germinação, podem ser influenciados por ação dos fitoquímicos sobre a permeabilidade de membranas, respiração, transcrição e tradução de DNA, funcionamento de mensageiros secundários, conformação das enzimas e receptores, por exemplo (SAUSEN et al., 2009).

Em relação ao crescimento das plântulas, o extrato EBR, apresentou aumento no crescimento do hipocótilo e da radícula, nas concentrações de 100 e 250, e aumento do hipocótilo na concentração de 1000, atingindo 44,22% e 97,79% de estímulo de crescimento do hipocótilo e radícula, em relação à água. Já a fração HEX, levou ao aumento do hipocótilo e da radícula, nas concentrações de 100, 250 e 750, atingindo 49,78%, 115% e 71% de estímulo de crescimento do hipocótilo e radícula, respectivamente, em relação à água.

A fração CLO, demonstrou aumento do crescimento do hipocótilo e da radícula (FIGURA 33), respectivamente, nas concentrações de 100 e 500, atingindo 33,69% e 83,28% de crescimento do hipocótilo e radícula, respectivamente, em relação à água. A fração RES, demonstrou aumento no crescimento da radícula na concentração de 250, e crescimento do hipocótilo e radícula, nas concentrações de 500, 750 e 1000, atingindo 22,23% e 108,20% no crescimento do hipocótilo e radícula, respectivamente, em relação à água. A fração FAC, não demonstrou diferenças estatísticas significativa no crescimento da radícula e hipocótilo, quando comparado ao controle negativo, água.

FIGURA 33 - CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* TRATADA COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: A: Extrato Bruto; B: Fração hexânica; C: Fração Clorofórmica; D: Fração Acetato de Etila; E: Fração Residual. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística a nível de 5% de significância para o teste de IVG.

Os resultados demonstraram que os extratos foram capazes de estimular o crescimento do hipocótilo e da radícula em relação a água, e apesar de pouco frequente, outros estudos também relataram o estímulo do crescimento da alface (ÁQUILA et al., 1999). Observou-se um comportamento não dose-dependente, para as amostras de EBR, HEX e CLO. Isso ocorre devido ao sinergismo das substâncias presentes, que em determinada concentração, apresentam as características necessárias para desempenhar determinada atividade biológica. Além disso, os efeitos alelopáticos de uma espécie, variam em função da idade e da parte da planta coletada. Outro fator a ser considerado, é que a produção e distribuição de aleloquímicos na planta, podem variar dentro de uma mesma espécie (SOUZA FILHA et al., 2003).

Foi observado no extrato e frações, a presença de esteroides e triterpenos, pelo ensaio de CCD. Estes compostos são importantes aleloquímicos, juntamente com os alcaloides, flavonoides, taninos e compostos fenólicos. (FIORENTINO et al., 2008; SCRIVANTI, 2010; ARECO et al., 2014). Estas substâncias são conhecidas por suas atividades alelopáticas (SAUSEN et al., 2009).

A fração RES, apresentou um efeito dose-resposta, bem como a presença de flavonoides no ensaio de CCD. No entanto, por se tratar da fração residual do processo de extração, é provável a presença de nutrientes na fração, como sais, aminoácidos e açúcares, que podem causar o estímulo de crescimento das plântulas (SAUSEN et al., 2009).

Apesar da presença destes compostos, é possível que várias outras substâncias possam atuar em conjunto para desempenhar o efeito estimulante do extrato e frações. Alguns estudos apontam que a alelopatia envolve um complexo de fitoquímicos, sendo que uma única substância não pode ser responsável sozinha, pela interferência no crescimento de plantas vizinhas. Isso ocorre porque não há somente interações bioquímicas brutas e efeitos nos processos fisiológicos, mas também, há mecanismos de ação a nível molecular, com sítios de ação específicos, que devem ser considerados (RIZVI et al., 1992; BEZUIDENHOUT et al., 2012).

O extrato EBR, demonstrou estímulo do crescimento das plântulas, nas concentrações mais baixas. Já as frações HEX e CLO, apresentaram estímulo de crescimento em concentrações baixas e intermediárias. Os resultados corroboram com levantamentos da literatura, que relatam o estímulo do crescimento do hipocótilo e da radícula de plantas, quando em baixas concentrações, sendo que em altas concentrações, geralmente pode ocorrer a inibição do crescimento (RICE 1984; PUTNAM; TANG, 1986).

É importante ressaltar que houve, portanto, um efeito alelopático do extrato e frações de *C. glandulosus*, uma vez que a alelopatia é um mecanismo de interferência benéfica ou prejudicial no crescimento de plantas associadas, no qual de substâncias químicas são liberadas, podendo estimular ou inibir o crescimento de outras espécies próximas (AHMED; WARDLE, 1994; GATTI et al., 2010). Dessa forma, extratos com potencial alelopático, também podem ser utilizados no controle de plantas parasitas, sendo aplicados no solo como estimulantes de germinação de sementes e crescimento das plântulas, minimizando as perdas na produção agrícola no futuro (MALLIK; WILLIAMS, 2009; SHINWARI et al., 2017).

Devido aos resultados encontrados para capacidade hemolítica, nas altas concentrações de HEX, os estudos com esta fração foram direcionados para o teste de capacidade larvicida em *Aedes aegypti*. Os resultados do ensaio larvicida com a fração HEX estão apresentados na TABELA 17. No entanto, nenhuma das concentrações apresentaram efeito larvicida nas condições avaliadas.

TABELA 17 - ENSAIO LARVICIDA DA FRAÇÃO HEXÂNICA EM *Aedes aegypti*

AMOSTRA	CL ₅₀	AMOSTRA	CL ₅₀
HEX 50	> 1000 µg/ mL	Água mineral	> 1000 µg/ mL

FONTE: O autor (2020).

NOTA: HEX: Fração Hexânica. CL₅₀: Concentração letal para 50 %.

Os resultados de atividade antimicrobiana (TABELA 18), demonstraram que o extrato bruto e frações, não foram efetivos contra o crescimento bacteriano. No entanto, a fração HEX, na concentração de 250 µg/mL, indicou potencial antifúngico moderado, contra *C. albicans*, e as frações FAC e RES, na concentração de 31,25 µg/mL, apresentaram bom potencial antifúngico contras cepas desse fungo.

TABELA 18 - RESULTADOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

MICRO-ORGANISMO	CIM µg/ml				
	EBR	HEX	CLO	FAC	RES
<i>S. aureus</i> ATCC 25913	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	>1000	250	>1000	31,25	31,25

FONTE: O autor (2020).

NOTA: EBR: Extrato Bruto; HEX: Fração Hexânica; RES: Fração Residual; CLO: Fração clorofórmica; FAC: Fração acetato de etila.

Na fração HEX, determinou-se a presença de esteroides e triterpenos, que podem estar relacionados à atividade antifúngica da fração, pois muitos esteroides e triterpenos glicosilados, exibem ação fungistática e fungicida. Os terpenos, são conhecidos por diversas atividades biológicas, incluindo a antibacteriana e antifúngica. Nesta classe, encontram-se os diterpenoides, que possuem capacidade antifúngica, devido à presença de um grupo ácido livre, na posição 18, e esta característica em sua estrutura, desempenha a habilidade de romper a membrana microbiana, o que pode justificar a ação antimicrobiana destes compostos (COWAN, 1999; KUMAR et al., 2007; TENE et al., 2009; ABDEL-NAIME et al., 2019).

A fração FAC e RES, demonstraram a presença de compostos fenólicos e flavonoides. Vários estudos têm demonstrado a ação antifúngica de compostos fenólicos, flavonoides e flavonoides glicosilados, principalmente contra *C. albicans*. Os flavonoides, principalmente aqueles glicosilados, possuem grande interesse em Estudos biológicos, devido à sua ação antibacteriana e antifúngica, entre outros efeitos biológicos. (OZCELIK et al., 2011; TEODORO et al., 2015; XIAO et al., 2016).

A capacidade antifúngica das frações de *C. glandulosus*, corrobora com outros estudos com espécies de *Croton*, que também apresentaram potencial antifúngico, contra *C. albicans*, como *Croton zambesicus*, *Croton urucurana*, *Croton heliotropiifolius*, *Croton macrostachys* (ABO et al., 1999; TENE et al., 2009; BARBIERI et al., 2014; QUEIROZ et al., 2014; OBEY et al., 2016). O potencial antifúngico das frações, sobre o crescimento de *C. albicans*, é significativo, pois este fungo está relacionado com a candidíase vaginal, candidíase atrófica e produção de aflatoxinas (ABO et al., 1999). Além disso, os tratamentos para *C. albicans*, têm um grande número de relatos de ineficiência, associado à resistência fúngica ao medicamento comumente utilizado, fluconazol (ALVIANO et al., 2005). Dessa forma, novos estudos com produtos naturais, podem levar a descoberta de fitoterápicos em potencial, para o tratamento de candidíase.

4.7 ESTUDOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *C. glandulosus*

4.7.1 Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos extratos e frações das partes aéreas de *C. glandulosus*

O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) possui metabólitos secundários como, terpenoides, alcaloides, polifenóis e flavonoides (BRAGA, 1960; JONE 2003; MACIEL et al., 2000). Em

vista da presença do flavonoide vitexina, determinou-se potencial antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais (TPC) do extrato e frações de *C. glandulosus*. Os resultados destes estudos estão apresentados na TABELA 19.

No ensaio de DPPH, tanto o extrato EBR ($CE_{50} = 35,25 \mu\text{g/mL}$) como a fração FAC ($CE_{50} = 37,33 \mu\text{g/mL}$), demonstraram significativo potencial antioxidante na captura deste radical, quando comparado ao padrão antioxidante rutina, que apresentou CE_{50} de $7,60 \mu\text{g/mL}$. Verificou-se que as frações CLO e RES também possuem significativa capacidade de captura do radical DPPH, com CE_{50} de $75,83$ e $86,74 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Entretanto, a fração HEX apresentou baixa capacidade antioxidante ($CE_{50} = 316,93 \mu\text{g/mL}$), quando comparado ao padrão rutina. Os resultados corroboram com ensaios de DPPH encontrados na literatura, de extratos de outras espécies de *Croton*, como por exemplo, *Croton argyratus*, *Croton bonpladianus*, *Croton sphaerogynus*, *Croton caudatus*, *Croton floribundus*; *Croton heliotripiifolius* e *Croton blanchetianus*, que demonstraram significativa capacidade antioxidante das espécies (MOHD ALI et al., 2012; BHAVANA; KALAIVANI; SUMATHY, 2015; SANTOS et al., 2016; SUBHASWARAJ et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017; BARTH et al., 2018).

TABELA 19 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E CORRELAÇÃO DE PEARSON, DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *C. glandulosus*

Amostra	DPPH	ABTS	FRAP	ORAC	FOSFO	TPC
EBR	$35,25 \pm 0,29^b$ $r = 0,958^*$	$907,01 \pm 4,01^c$ $r = 0,994^*$	$1545,28 \pm 5,15^d$ $r = 0,972^*$	$282,31 \pm 2,31^b$ $r = 1,00^*$	$164,27 \pm 13,37^b$ $r = 0,977^*$	$71,36 \pm 7,23^c$ -
HEX	$316,93 \pm 2,55^c$ $r = 0,948^*$	$95,82 \pm 1,36^a$ $r = 0,945^*$	$478,13 \pm 0,93^a$ $r = 0,945^*$	$157,35 \pm 5,05^a$ $r = 0,731$	$338,72 \pm 1,88^c$ $r = 0,945^*$	$12,54 \pm 3,28^a$ -
CLO	$75,83 \pm 2,15^c$ $r = 0,963^*$	$557,22 \pm 2,08^c$ $r = 0,996^*$	$1375,18 \pm 5,65^c$ $r = 0,997^*$	$381,92 \pm 0,71^c$ $r = 0,933$	$259,05 \pm 0,45^c$ $r = 0,987^*$	$86,39 \pm 4,50^d$ -
FAC	$37,33 \pm 0,28^b$ $r = 0,976^*$	$655,89 \pm 5,82^d$ $r = 0,999^*$	$2503,93 \pm 5,71^c$ $r = 0,994^*$	$668,25 \pm 3,58^d$ $r = 0,972$	$154,51 \pm 0,32^b$ $r = 0,999^*$	$185,94 \pm 8,10^c$ -
RES	$86,74 \pm 1,63^d$ $r = 0,973^*$	$455,00 \pm 3,42^b$ $r = 0,994^*$	$1064,26 \pm 1,04^b$ $r = 0,988^*$	$156,41 \pm 0,72^a$ $r = 0,977$	$77,25 \pm 0,02^a$ $r = 0,996^*$	$51,30 \pm 3,39^b$ N.a.
RUT	$7,60 \pm 0,15^a$	$3620,82 \pm 4,53^f$	$7212,32 \pm 14,45^f$	N.a	$313,93 \pm 0,27^d$	N.a.

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Resultados da capacidade antioxidante expressos em: DPPH (CE_{50}); ABTS ($\mu\text{mol eq.trolox.g}^{-1}$), FRAP ($\mu\text{mol eq.sulfato ferroso.g}^{-1}$), ORAC ($\mu\text{mol eq.trolox.g}^{-1}$); FOSFO: Fosfomolibdênio ($\text{mg eq.ácido áscórbico.g}^{-1}$); TPC: Teor de compostos fenólicos (mg.EAG.g^{-1}). EBR: Extrato Bruto; HEX: Fração Hexânica; CLO: Fração Clorofórmica; FAC: Fração Acetato de Etila; RES: Fração Residual; RUT: Rutina. Resultados expressos em média aritmética e \pm Desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si à nível de 5% de significância pelo teste ANOVA post-hoc de Tukey. r = Coeficiente de correlação de Pearson. * Correlação significativa no nível de 0,01. N.a. = Não se aplica ou não foi realizado o teste.

No ensaio de captura do ABTS^+ , o extrato EBR ($907,01 \mu\text{mol eq.trolox.g}^{-1}$) apresentou o melhor resultado entre as frações, seguido da fração FAC ($655,89 \mu\text{mol eq.trolox.g}^{-1}$). As frações CLO e RES, demonstraram capacidade de captura do ABTS^+ .

mediana, já a fração HEX apresentou baixo potencial antioxidante. Esses resultados corroboram com estudos de outras espécies de *Croton* que também demonstraram significativo potencial de captura do ABTS^{•+}, como *Croton sphaerogynus*, *Croton gratissimus*, *Croton campestris*, *Croton argyrophyllus* e *Croton heliotropiifolius* (SANTOS et al., 2016; JUNIOR et al., 2016; NJOYA et al., 2018; SILVA BRITO et al., 2018). O ensaio de captura do DPPH[•] e ABTS^{•+} são métodos baseados no sequestro de radicais livres por uma substância doadora de próton, sendo que ambos os testes são muito utilizados para avaliação o potencial antioxidantes de produtos naturais (NETO et al., 2016).

A fração FAC demonstrou ação antioxidante significativa (2503,93 $\mu\text{mol eq.sulfato ferroso.g}^{-1}$) no ensaio de FRAP, seguida do extrato EBR (1545,28 $\mu\text{mol eq.sulfato ferroso.g}^{-1}$). As frações CLO e RES, apresentaram capacidade antioxidante intermediária, e a fração HEX, demonstrou o menor efeito antioxidante. Os resultados encontrados corroboram com estudos de outras espécies de *Croton*, que demonstraram ação antioxidante por meio da redução do ferro, como *Croton sphaerogynus*, *Croton campestris*, *Croton gratissimus*, *Croton zambesicus* e *Croton sparsiflorus* (NDHLALA et al., 2013; SHAHWAR et al., 2015; SANTOS et al., 2016; JUNIOR et al., 2016). O método FRAP pode ser adequado para avaliação de antioxidantes em plantas, pois mede a capacidade antioxidante de forma direta, outros ensaios, no entanto, são geralmente indiretos e medem a inibição de espécies reativas (radicais livres) geradas na mistura de reação (HALVORSEN et al., 2002).

No ensaio de ORAC, a fração FAC demonstrou o melhor efeito antioxidante (668,25 $\mu\text{mol eq.trolox.g}^{-1}$). Já as frações CLO e EBR, apresentaram efeito mediano, e os menores valores de capacidade antioxidante foram observados nas frações RES e HEX. Os resultados encontrados para *C. glandulosus*, corroboram com dados da literatura para a espécie de *Croton*, demonstrando a capacidade antioxidante de outras espécies, como *Croton sphaerogynus* e *Croton oblongifolius* (SANTOS et al., 2016; WIJESEKERA, 2017).

O ensaio de ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio), diferentemente do ensaio de captura dos radicais DPPH e ABTS, é baseado na transferência de átomos de hidrogênio, avaliando a capacidade de inibição do radical peroxil pelo composto antioxidante. O radical peroxil é formado pela degradação térmica do AAPH (dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano), que leva à oxidação da fluoresceína, e consequentemente a perda de sua fluorescência. Os compostos antioxidantes atuam por meio da transferência de um átomo de hidrogênio ao radical livre, evitando a degradação da fluoresceína (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001; HUANG et al., 2002; HUANG; OU; PRIOR, 2005; KARADAG

et al. 2009). Além disso, este ensaio torna-se relevante por utilizar fonte de radicais que se assemelham ao sistema biológico (THAIPONG et al., 2006).

Observou-se que os extratos com maior teor de compostos fenólicos e maior teor de vitexina, demonstraram melhor potencial antioxidante. Alguns estudos demonstram que o potencial antioxidante dos flavonoides, está relacionado com suas características estruturais, como a presença de um grupo catecol no anel B (e duas hidroxilas vicinais). Entretanto, nos ensaios de captura de íons metálicos, alguns estudos demonstram um alto potencial antioxidante devido à presença dos grupos hidroxilas dos flavonoides (HEIM et al., 2002; KUMAR; PANDEY, 2013; SANTOS et al., 2016).

No ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio, a fração HEX (338,72 mg eq.ácido áscórbico.g⁻¹) apresentou a melhor capacidade antioxidante dentre os extratos, seguido da fração CLO (259,05 mg eq.ácido áscórbico.g⁻¹). Os resultados de capacidade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio, para o extrato e frações de *C. glandulosus*, corroboram com estudos reportados na literatura, com outras espécies de *Croton*, como *Croton penduliflorus* e *Croton corchoropsis*, por exemplo (NETO et al., 2016; BAAH et al., 2017).

O método do fosfomolibdênio é baseado na redução de Mo (IV) a fosfato verde/Mo (V) (PIETRO et al., 1999), neste ensaio, a amostra HEX apresentou menor correlação com o TPC. Apesar da fração HEX ter demonstrado menor potencial antioxidante nos ensaios de DPPH, ABTS, FRAP e ORAC, para o ensaio de fosfomolibdênio, a fração HEX, apresentou a melhor capacidade antioxidante em relação aos demais extratos. Isso se justifica devido as características apolares da fração hexânica, pois o ensaio de fosfomolibdênio é uma ótima alternativa para determinação da capacidade antioxidante de moléculas lipofílicas em extratos vegetais, óleos vegetais, manteigas, preparações cosméticas e farmacêuticas, soro humano, entre outras (PIETRO et al., 1999).

As amostras CLO, EBR, FAC e RES, também demonstraram capacidade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio, e apesar de menos apolares, a capacidade de redução do complexo fosfomolibdênio destas amostras, pode estar relacionada à outras substâncias, como ácido ascórbico, fenóis, tocoferóis, carotenoides e flavonoides, que segundo Pietro et al., (1999), também podem responder à este ensaio.

Verificou-se que o potencial antioxidante dos extratos tem comportamento dose-resposta, ou seja, aumenta gradualmente conforme aumenta-se a concentração das amostras, sendo os mesmos resultados observado por Sharma et al. (2010), no estudo com *Croton sparsiflorus*. Além disso, observou-se que, vários compostos são responsáveis pela ação

antioxidante do extrato e frações de *C. glandulosus*. Observou-se que, alguns extratos demonstram melhor ação para um determinado método, e menor ação em outros. Isso ocorre devido à matriz complexa de metabólitos contidas nos extratos, que por interações sinérgicas, desempenham uma determinada ação biológica (LILA; RASKIN 2005). Devido à esta complexidade na composição química dos extratos e frações de espécies vegetais, metodologias com diferentes mecanismos químicos são necessários para atestar a real capacidade antioxidante de uma amostra vegetal (GUPTA; GUPTA, 2011).

Em relação aos compostos fenólicos (TPC), a fração FAC demonstrou maior teor (185,94 mg.EAG.g⁻¹), seguido da fração CLO (86,39 mg.EAG.g⁻¹) e extrato EBR (71,36 mg.EAG.g⁻¹). A fração RES apresentou um teor intermediário, seguido da fração HEX, com baixo teor de compostos fenólicos totais.

No teste estatístico de correlação de Pearson, a fração FAC demonstrou o maior valor de *r* no ensaio de DPPH, sendo que no ensaio de ABTS, o extrato EBR e frações CLO e FAC, demonstram os maiores valores de *r*. No teste de FRAP, observou-se os maiores valores de *r* para as frações CLO e FAC. No ensaio de ORAC, o extrato EBR foi o único com valor de *r*=1, que apresentou correlação positiva muito forte e significativa. As demais frações, apesar de apresentarem correlação positiva muito forte, não demonstraram correlação significativa. A fração HEX, demonstrou correlação positiva forte, não sendo significativa. No teste de redução de fosfomolibdênio, verificou-se os maiores valores de *r*, para as frações FAC e RES, e o menor valor de *r* para a fração HEX, sendo que ambos os extratos demonstraram correlação positiva muito forte e significativa.

O alto teor compostos fenólicos também foi observado em outras espécies do gênero, *Croton bonplandianum* Baill e *Croton Sparsiflorus* (SHARMA et al., 2010; SISODIA; SIDDIQUI, 2010). Estes resultados corroboram com estudos da composição química de outras espécies do gênero, como *Croton bonplandianum* Baill e *Croton sparsiflorus*, que demonstraram significativo valor de TPC (SHARMA et al., 2010; SISODIA; SIDDIQUI, 2010).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal e exibem fortes antioxidantes devido à sua química estrutural ideal para a eliminação de radicais livres (RICE-EVANS et al., 1997; PRIOR; CAO, 2000). Geralmente, o potencial antioxidante está correlacionado ao conteúdo fenólico que pode ser determinado pelo método de Folin-Ciocalteau (DUDONNE et al., 2009). Os resultados de potencial antioxidante e teor de compostos fenólicos demonstrados no extrato e frações de *C. glandulosus*, corroboram com a literatura pois, as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos são bem conhecidas e

estudadas, principalmente pela capacidade em capturar radicais livres e evitar o estresse oxidativo (GUPTA; GUPTA, 2011).

Este potencial antioxidante dos polifenóis, ocorre devido ao seu potencial redox, que atua por meio de muitos mecanismos. Eles são bons doadores de elétrons, têm capacidade de reduzir o íon férrico ao íon ferroso (RICE-EVANS et al., 1997; SHON et al., 2004). Dentre a os compostos fenólicos mais comuns nas plantas, encontram-se os flavonoides. Como verificado em testes fitoquímicos preliminares, CCD, HPLC e RMN, pode-se verificar a presença de flavonoides e flavonoides glicosilados (vitexina) nos extratos de *C. glandulosus*. Diante destes resultados, acredita-se que grande parte do potencial antioxidante do extrato e frações, estejam relacionados com a presença de flavonoides, e principalmente do flavonoide vitexina, isolado nesta espécie.

A vitexina é conhecida por sua capacidade antioxidante, demonstrada em ensaios de captura do radical DPPH e do cátion radical ABTS. Além disso, alguns estudos demonstraram seu potencial farmacológico, como a capacidade de reduzir a nefrotoxicidade *in vivo*, potencial hepatoprotetor, redução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelos experimentais com células de HepG2, expostas ao peróxido de hidrogênio, modulação da atividade e expressão de enzimas antioxidantes endógenas, redução do estresse oxidativo e manutenção da homeostase redox celular (MOHAMED et al., 2009; KHOLE et al., 2016; DUTTA et al., 2018).

Devido ao potencial antioxidante dos extratos de *C. glandulosus*, estes podem ser utilizados na avaliação de atividades biológicas e farmacológicas, visando a investigação de doenças relacionadas à formação espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), pois sabe-se que as moléculas antioxidantes podem prevenir a formação excessiva de RONS, inibindo a sua ligação com estruturas ou moléculas biológicas (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999; LOBO et al., 2010; VERMA et al., 2012; IGHODARO; AKINLOYE, 2018; NASMA et al., 2018).

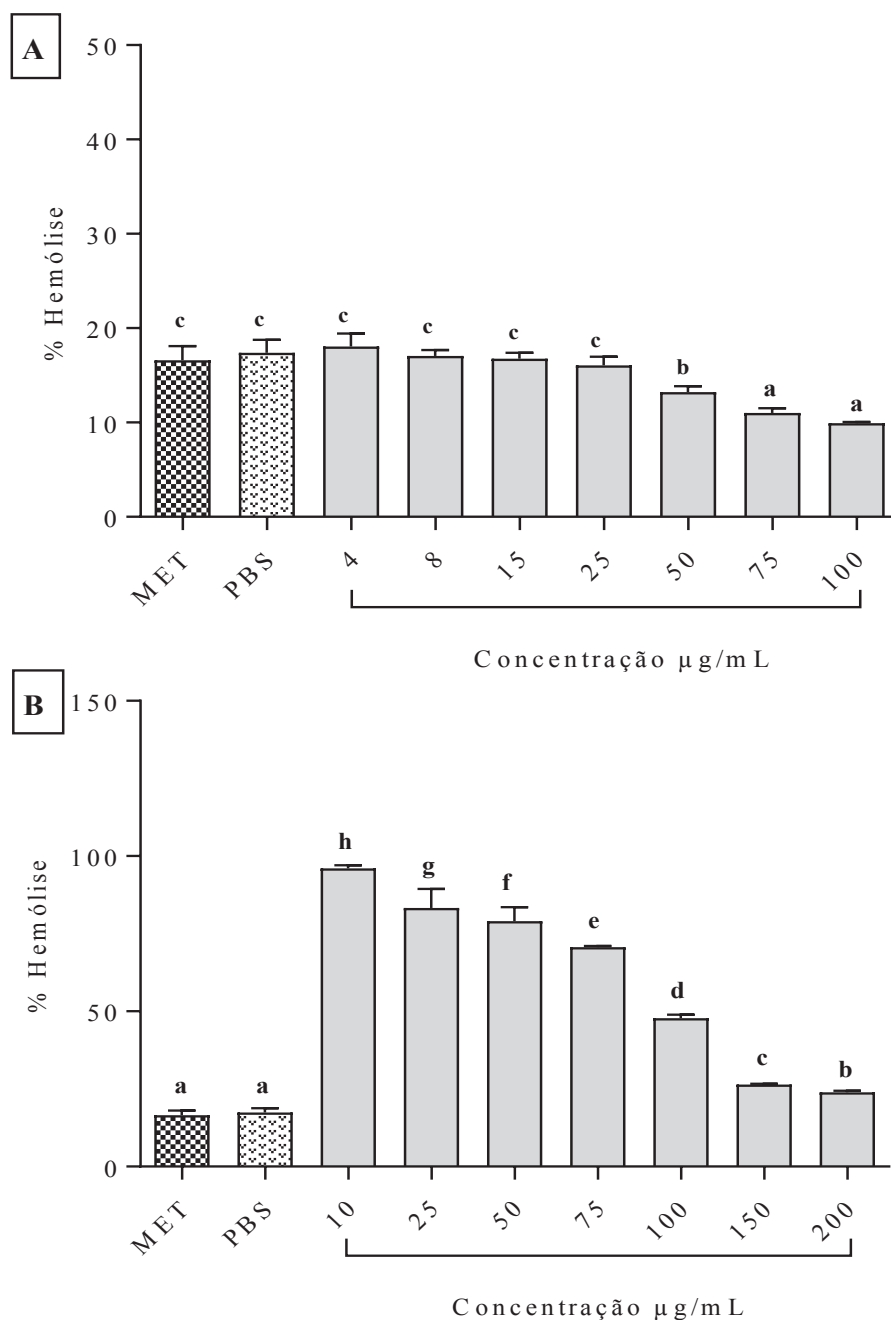
4.8 ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *C. glandulosus*

4.8.1 Ensaio antioxidante em eritrócitos de carneiro induzido por AAPH

O ensaio de antioxidante em eritrócitos de carneiro foi realizado para as frações FAC e RES. Como observado no ensaio de hemólise, estas frações demonstraram redução na

capacidade hemolítica nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$, inferior ao controle negativo do teste (PBS). Para verificar o comportamento antioxidante celular, realizou-se o ensaio anti-hemolítico, sobre ação do agente produtor de radicais livres, AAPH (ABAP). Os resultados deste ensaio estão demonstrados na FIGURA 34.

FIGURA 34 - ATIVIDADE ANTI-HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS SOBRE AÇÃO DO RADICAL AAPH



FONTE: O autor (2020).

NOTA: A: Fração acetato de etila; B: Fração residual. Os resultados foram expressos em média aritmética \pm Desvio padrão. Letras iguais no mesmo gráfico, não diferem estatisticamente entre si à nível de 5% de significância pelo teste ANOVA *post-hoc* de Tukey.

As frações demonstraram eficiência na inibição da hemólise causada por radicais peroxil, formados pela degradação do AAPH. Quando eritrócitos são submetidos à uma suspensão de PBS, eles permanecem estáveis, sendo observado uma pequena taxa de hemólise. A adição do iniciador de radicais livres AAPH, na suspensão, leva à indução de hemólise, por meio de peroxidação lipídica, reduzindo também o teor de GSH intracelular (BENEDETTI et al. 2004).

Observou-se a ação anti-hemolítica da fração FAC, nas concentrações de 50, 75 e 100 µg/mL. Para a amostra RES, apesar dos valores não demonstrarem redução antioxidante significativa estatisticamente, quando comparada ao controle negativo PBS, observou-se redução hemolítica dose-dependente, na faixa de 10 a 200 µg/mL. Estes resultados indicam que as frações são capazes de reduzir o dano celular, causado pelo APPH, nos eritrócitos e corroboram com estudos de extratos vegetais, que demonstraram ação anti-hemolítica, por inibição da peroxidação lipídica, como por exemplo, os extratos das flores de *Clitoria ternatea*, *Quercus ilex*, *Pinus halepensis*, *Xanthium strumarium*, *Actinidia arguta* entre outros. (PHRUEKSANAN; YIBCHOK-ANUN; ADISAKWATTANA, 2014; CYBORAN-MIKOŁAJCZYK et al., 2018; GUEMMAZ et al., 2018; MEZITI et al., 2019).

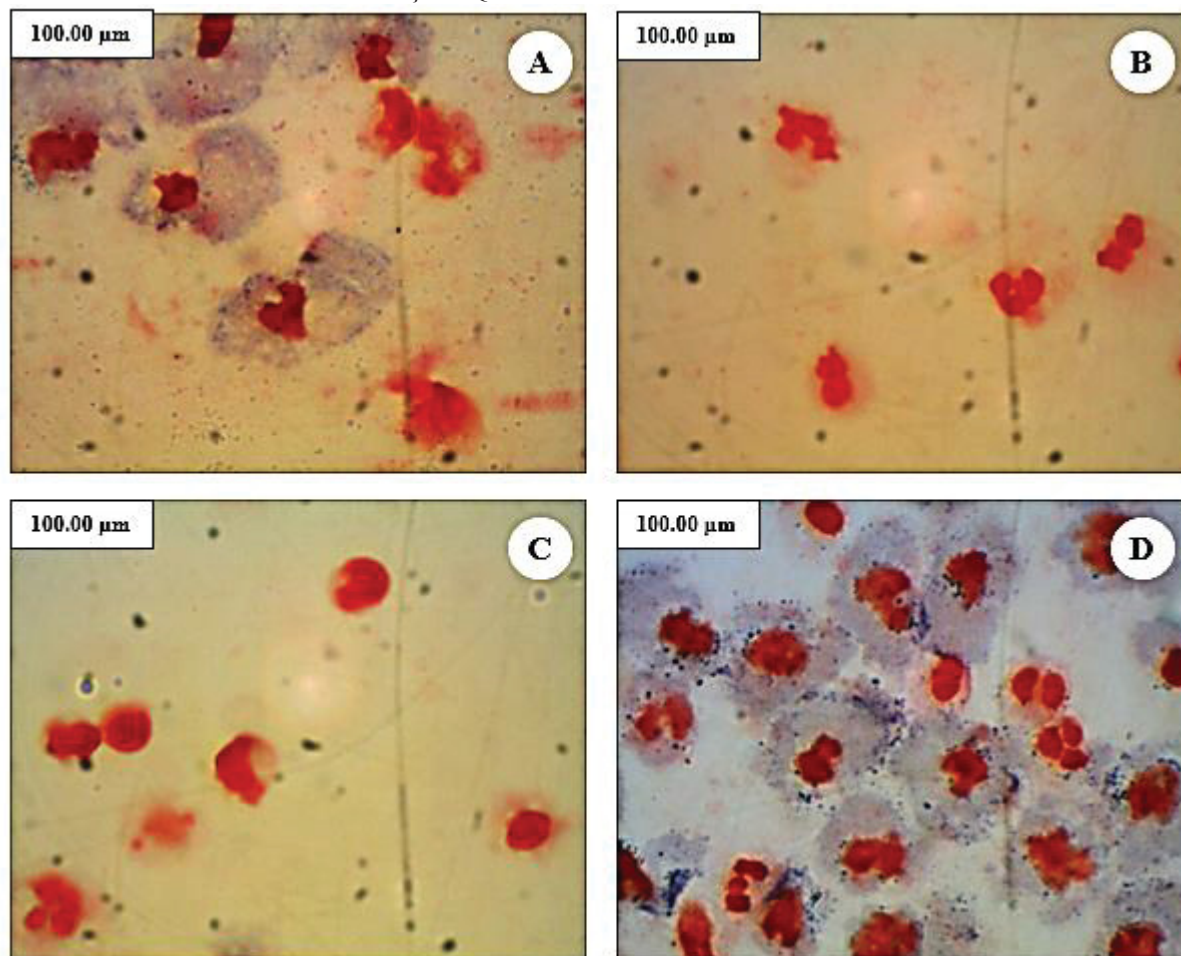
Verificou-se que estas frações não demonstraram toxicidade preliminar nos ensaios de *A. salina* e alelopatia. Sugere-se que a proteção hemolítica, esteja relacionada à presença de compostos fenólicos e antioxidantes nas frações, bem como a ausência de substâncias hemolíticas, como saponinas, taninos e triterpenos, conforme verificado no teste de CCD. Além disso, os resultados estão em concordância com os obtidos no teste ORAC, que demonstra a capacidade de captura de radicais peroxil.

A ação anti-hemolítica das frações de *C. glandulosus*, pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, que possuem capacidade antioxidante conhecida. Segundo estudos de Chirinos et al. (2008), os efeitos anti-hemolítico de extratos de *Tropaeolum tuberosum*, estão relacionados ao teor de compostos fenólicos que atuam de forma sinérgica ou antagonista a outros compostos químicos presentes em seus extratos, reduzindo a oxidação lipídica. Estes compostos atuam na proteção da membrana dos eritrócitos, impedindo o rompimento desta por ação dos radicais peroxil (KITAGAWA; SAKAMOTO; TANO, 2004; MAGALHÃES et al., 2009; EREN-GUZELGUN; INCE; GURER-ORHAN, 2018; GRZESIK et al., 2018; WANG et al., 2019).

4.8.2 Ensaio de verificação de ânions superóxidos em neutrófilos humanos

No ensaio qualitativo de redução do NBT (tetrazólio nitroazul), foi possível visualizar a superfície de ativação dos neutrófilos, induzida pela vitexina, por meio da formação de depósitos de formazan (FIGURA 35).

FIGURA 35 - ATIVAÇÃO QUALITATIVA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS



FONTE: O autor (2020).

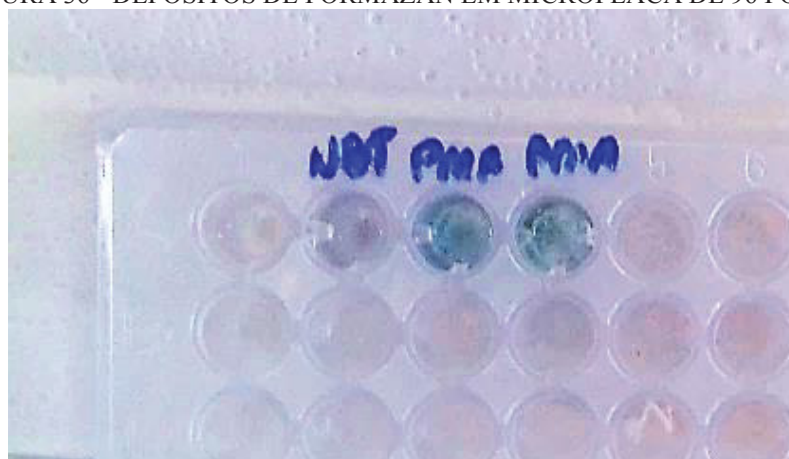
NOTA: A: ativação de neutrófilos pela Vitexina; B: Neutrófilos humanos normais; C: Neutrófilos humanos em NBT; D: Neutrófilos humanos ativados pelo PMA.

O teste de redução do NBT é um dos métodos mais utilizados para a avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, avaliando sua ação bactericida (NATHAN 1974; ROTH et al. 1983). O método é baseado na redução do NBT por ânions superóxidos, que geram precipitados insolúveis de coloração azul, conhecidos como depósitos de formazan. A avaliação da ativação dos neutrófilos é realizada por meio da microscopia óptica, sendo que a localização do formazan é muito heterogênea, podendo estar presente na membrana da célula ou no interior dos fagócitos (NATHAN 1974; FONTEQUE et al., 2015).

Os resultados foram comparados ao controle positivo PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato) e demonstraram a formação de depósitos de formazan, no interior dos neutrófilos, resultante de sua ativação pelo flavonoide vitexina isolado de *C. glandulosus*. O PMA é um éster de forbol, estes compostos são produzidos por óleos de espécies da família Euphorbiaceae, como por exemplo *Croton tiglium*. O PMA causa estímulo dos neutrófilos, sendo que esta ativação não é realizada pelas vias clássicas de receptores de membrana. Esta substância atua na bicamada lipídica da célula, como intermediário para a proteína quinase C reativa (PCK). Por sua vez, a PCK atua no processo de sobrevivência, crescimento, proliferação, migração e apoptose celular (REPINE et al., 1974; SANTOS; ARAÚJO, 2000; WU-ZHANG; NEWTON, 2013).

No ensaio quantitativo de NBT, observou-se a formação dos depósitos de formazan nos poços das microplacas (FIGURA 36), cuja absorbância foi avaliada e os resultados expressos em densidade ótica (FIGURA 37).

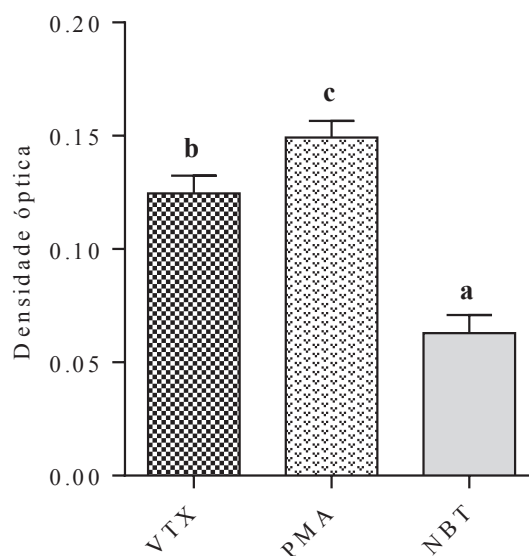
FIGURA 36 - DEPOSITOS DE FORMAZAN EM MICROPLACA DE 96 POÇOS



FONTE: O autor (2020).

NOTA: NBT: nitroazul de tetrazólio; PMA: acetato miristato de forbol.

FIGURA 37 - ATIVAÇÃO QUANTITATIVA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS



FONTE: O autor (2020).

NOTA: VTX: Ativação de neutrófilos pela Vitexina; PMA: Neutrófilos humanos ativados pelo PMA; NBT: Neutrófilos humanos em NBT. Os resultados foram expressos em média aritmética \pm Desvio padrão. Letras iguais no mesmo gráfico, não diferem estatisticamente entre si à nível de 5% de significância pelo teste ANOVA *post-hoc* de Tukey.

Os resultados quantitativos, demonstraram ativação dos neutrófilos pela vitexina (VTX), com 17% de diferença do padrão PMA. O ensaio de ativação de neutrófilos humanos, apresenta relevância no estudo de produtos naturais, pois, juntamente com a cascata de ativação dos neutrófilos, ocorrem eventos relacionados à atividade microbicida, como desgranulação, fagocitose e geração de EROS. Uma ativação elevada dos neutrófilos, pode fazer com que esta célula produza armadilhas extracelulares denominada NETs (Neutrophil Extracellular Traps), capazes de capturar alguns patógenos (KRUGER et al., 2015).

A vitexina apresentou efetiva ativação neutrófilos (83%), em relação ao controle PMA. Outros estudos com extratos vegetais, também demonstraram a ativação de neutrófilos, com estímulo da redução intracelular de NBT, como extratos e isolados de *Ricinus communis*; *Ziziphus jujuba* e *Caesalpinia pulcherrima* (GANACHARI; KUMAR; BHAT, 2004; KUMAR; SINGH; GHOSH, 2011; MADAGUNDI et al., 2012). Estudos demonstram que os extratos vegetais, e seus agentes imunomoduladores, como polissacarídeos, lecitinas, flavonoides e taninos, aumentam a resposta imunológica e a resposta do corpo, contra patógenos. Entretanto, é necessário que estudos sistêmicos sejam realizados para fundamentar as hipóteses terapêuticas destes agentes. Pois, a etapa final da fagocitose é a morte intracelular do micro-organismo, pelos neutrófilos, o qual dependente do impulso metabólico e ativação

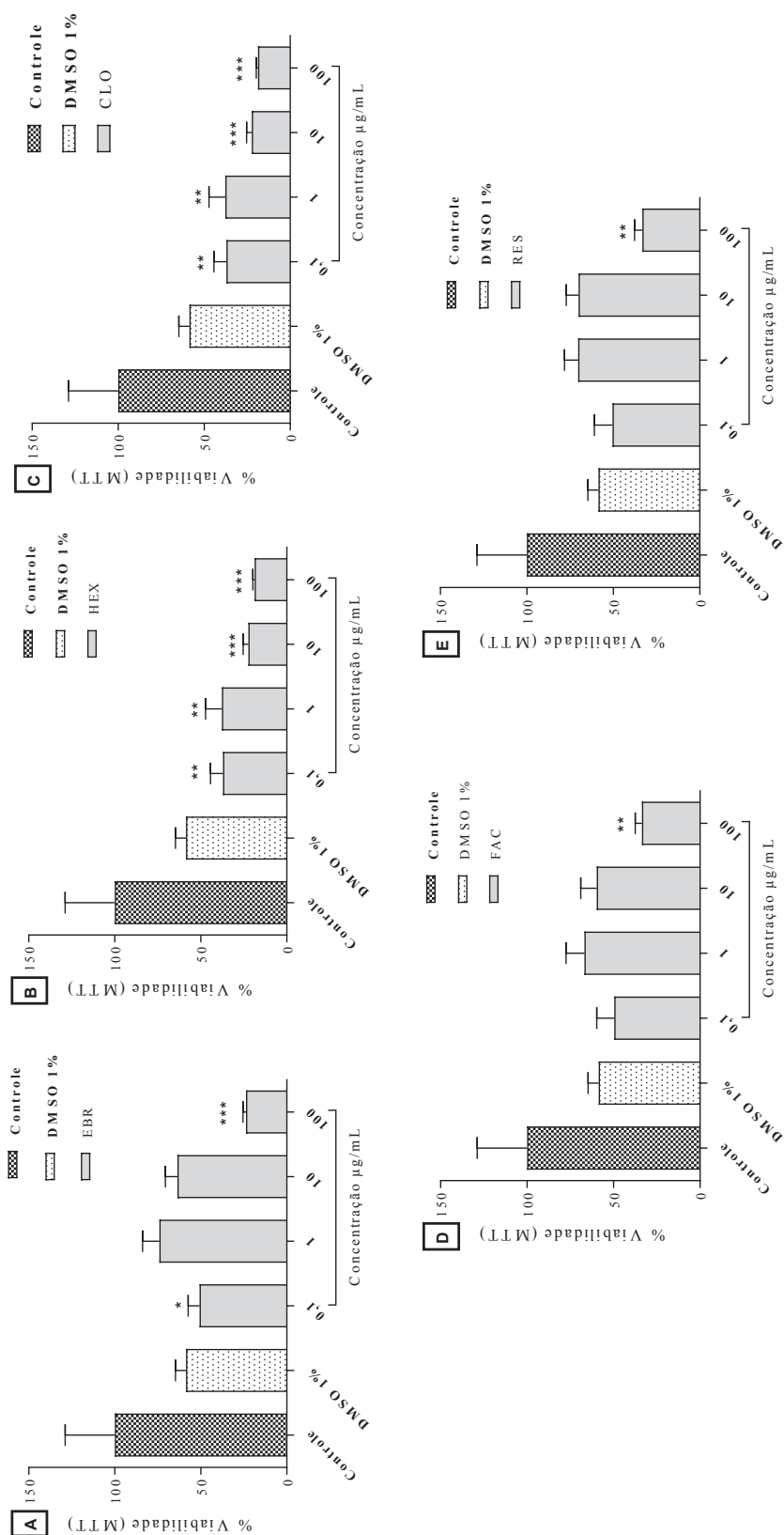
dos neutrófilos para desempenhar a atividade microbicida (DANIEL et al., 1994; BRITISH PHARMACOPEIA, 1999; FULZELE et al., 2003).

Os neutrófilos possuem como principal função a fagocitose. Estas células são importantes em processos infecciosos causados por micro-organismos, pois são o primeiro tipo celular a migrar para o local da inflamação (JUNIOR et al., 2007). Entretanto, como componente da resposta imune inata e adaptativa, também desempenham um papel importante na imunidade (DOEING et al., 2003; JUNIOR et al., 2007; AMULIC et al., 2012). Dessa forma, para atestar a resposta imunomoduladora da vitexina, são necessários um ensaio sistemático, incluindo além do ensaio de NBT, os ensaios, fagocitose de cepas mortas de *Candida albicans*, locomoção de neutrófilos e quimiotaxia (KUMAR; SINGH; GHOSH, 2011).

4.8.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT de neuroblastoma humanos

Para investigar o efeito citotóxico dos extratos, realizou-se o ensaio de viabilidade celular das linhagens de neuroblastoma BE-M17 e CHLA-20 (FIGURA 38 e 39).

FIGURA 38- AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT DE NEUROBLASTOMA HUMANO BE-M17 TRATADO COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*



FONTE: O autor (2020).

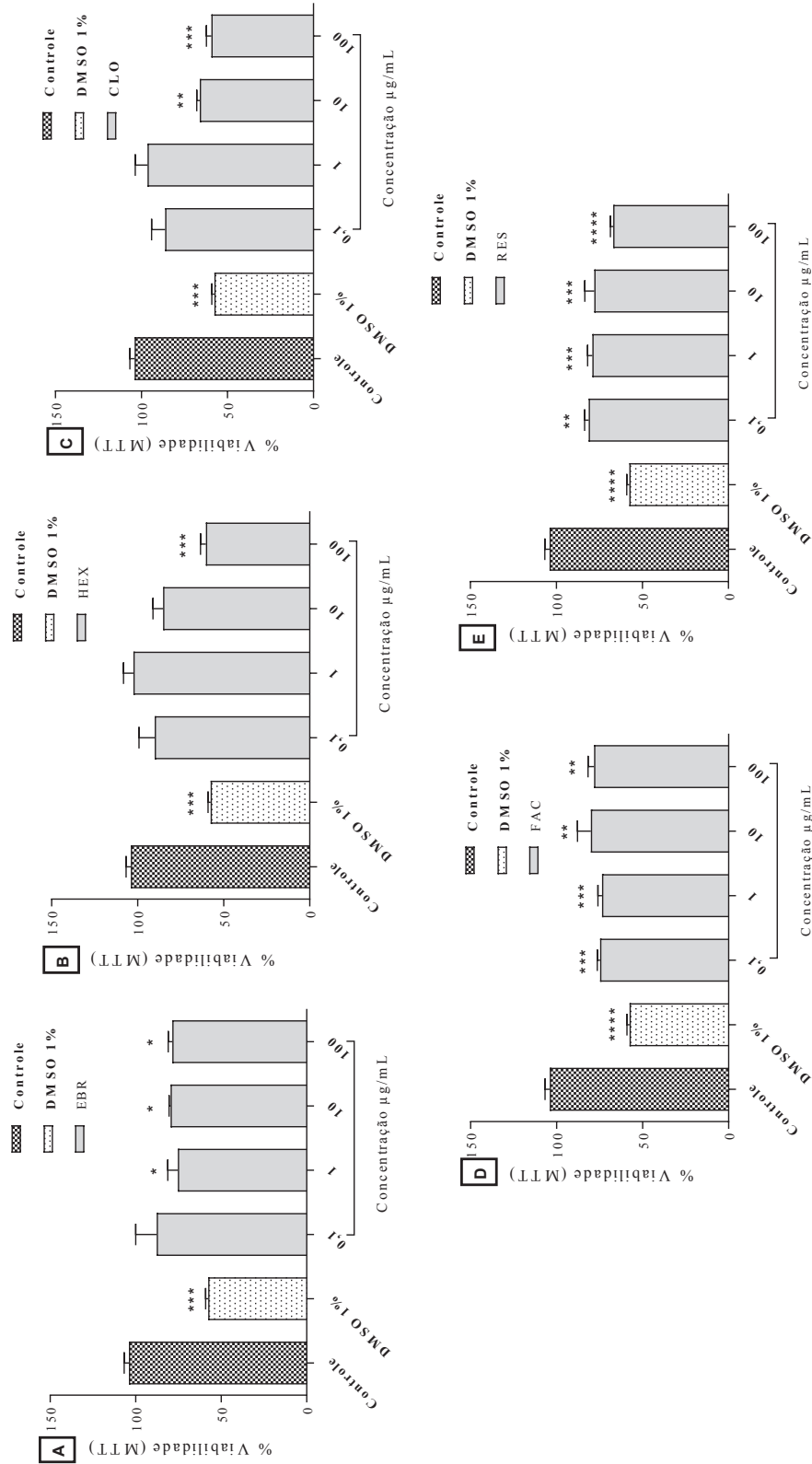
NOTA: A: Extrato bruto; B: Fração hexânica; C: Fração clorofórmica; D: Fração acetato de etila; E: fração residual. Dados expressos em média ± Erro padrão. As análises foram realizadas por meio do teste one-way ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001 comparado ao Controle.

No ensaio de MTT para a linhagem de neuroblastoma BE-M17, observou-se um comportamento não-dose dependente para o extrato EBR, o qual demonstrou efetiva ação citotóxica, na concentração de 0,1 µg/mL. As frações FAC e RES, também demonstraram potencial citotóxico não-dose dependente, porém para esta linhagem celular, estas frações apresentaram citotoxicidade, apenas na maior concentração do extrato (100 µg/mL). As frações HEX e CLO, apresentaram comportamento dose-resposta, e uma efetiva citotoxicidade nas concentrações de 0,1 µg/mL.

O comportamento não-dose dependente, está relacionado ao sinergismo/ antagonismo de compostos químicos presentes nos extratos, que levam à ação citotóxica quando atingem uma concentração específica, ideal para esta atividade. Pois, uma única molécula não pode ser responsável sozinha pelas funções biológicas de um extrato, e vários compostos, não podem ser responsáveis por uma única ação biológica (MALHEIROS e PERES, 2001; LILA e RASKIN, 2005).

Neste ensaio, verificou-se que as frações mais lipofílicas, demonstraram melhor potencial citotóxico para a linhagem BE-M17. Estes resultados corroboram com os dados obtidos neste estudo, que demonstram o potencial antioxidante da fração HEX, pela técnica de fosfomolibdênio, bem como toxicidade celular no ensaio de hemólise, devido à presença de grupos químicos como esteroides, triterpenos, taninos e cumarinas. Já a fração CLO, demonstrou potencial antioxidantes em várias técnicas, bem como a presença de esteroides, triterpenos, flavonoides, polifenóis e cumarinas. Os resultados de citotoxicidade de neuroblastoma da linhagem CHLA-20, estão demonstrados na FIGURA 39.

FIGURA 39 - AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT DE NEUROBLASTOMA HUMANO CHLA-20 TRATADO COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE *C. glandulosus*



FONTE: O autor (2020).

NOTA: A: Extrato bruto; B: Fração hexânica; C: Fração cloroformica; D: Fração acetato de etila; E: Fração residual. Dados expressos em média ± Erro padrão. As análises foram realizadas por meio do teste one-way ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001 comparado ao Controle.

No ensaio de MTT com neuroblastoma CHLA-20, observou-se que as melhores respostas foram encontradas para as frações FAC e RES, que tiveram ação na concentração de 0,1 µg/mL. O extrato EBR, também demonstrou significativa redução da viabilidade celular na concentração de 1 µg/mL. Já as frações CLO e HEX, demonstraram citotoxicidade nas maiores concentrações dos extratos. Devido a composição química complexa dos extratos, pode-se verificar, que cada extrato ou fração, possui um comportamento diferente, frente à determinadas linhagens celulares (LILA; RASKIN, 2005).

Dessa forma, verificou-se de forma geral, o potencial antitumoral de *C. glandulosus*, cujos resultados corroboram com estudos de outras espécies de *Croton*, que demonstraram efeito antiproliferativo em várias linhagens tumorais, como *C. cajucara* (MACIEL et al., 2007) que citotoxicidade contra linhagens celulares de K562 e *C. macrobothrys*, que demonstrou efeito antitumoral contra linhagens de NCI-H460 (MOTTA et al., 2011). Também foram reportados a ação antitumoral de câncer de estômago e cólon de *C. palanostigma* (SANDOVAL et al., 2002); atividade antiproliferativa de *C. lechleri* contra células leucêmicas K562 (ROSSI et al., 2003) e potencial antitumoral de extratos das folhas e talos de *C. erythroxyloides* (SAVIETTO et al., 2013).

Podemos sugerir que todos os extratos de *C. glandulosus* apresentaram efeitos citotóxicos sobre as linhagens celulares de neuroblastoma, BE-M17 e CHLA-20, em diferentes graus de sensibilidade, demonstrando seu potencial para ensaios antitumorais *in vivo*. O que pode estar relacionado com a presença de compostos com capacidade antioxidante e polifenóis, que possuem efeito na redução de radicais livres, os quais causam danos à várias células e estão relacionados à várias doenças, incluindo o câncer (SHON et al., 2004).

Além disso, o estudo de produtos naturais na terapia do câncer é importante, no tratamento de tumores agressivos, como o neuroblastoma, que resulta em altas taxas de mortalidade infantil, pois o tumor se desenvolve no sistema nervoso de pacientes pediátricos. Além disso, os tratamentos atuais são muito agressivo e tóxicos, e o uso de produtos naturais com potencial antitumoral, podem representar uma alternativa a estes tratamentos (COLIC; PAVELIC, 2000; MARIS et al., 2007; KAMIHARA et al., 2017; WONG et al., 2018).

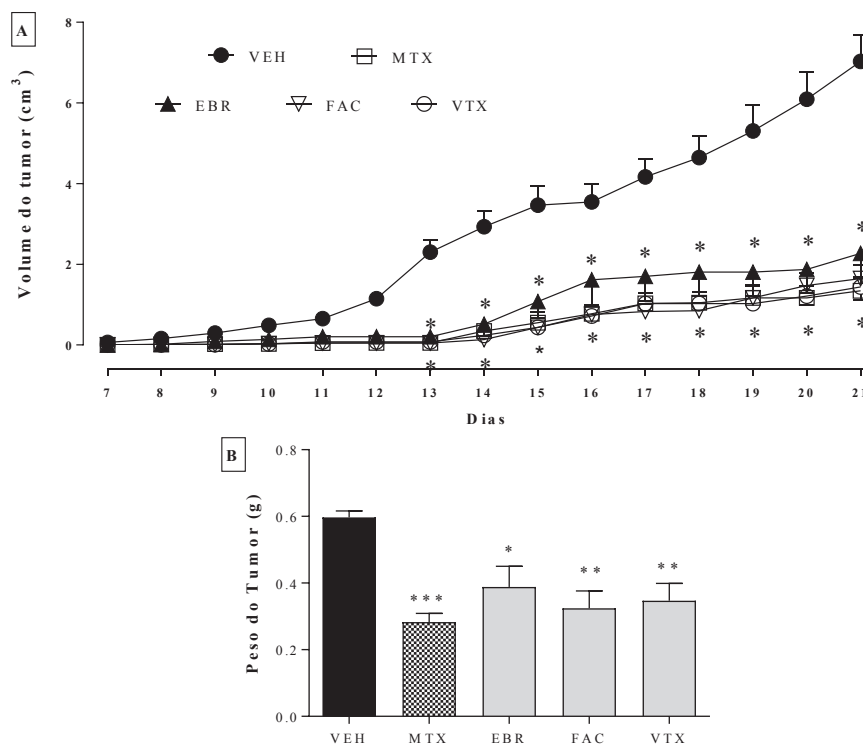
4.9 ENSAIOS DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS *IN VIVO* DO EXTRATO EBR, FRAÇÃO FAC E VITEXINA.

4.9.1 Avaliação da atividade antitumoral em modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich em camundongos *Swiss*

O tumor tornou-se visível após o 7º dia, o qual iniciou-se o processo de medição do volume. Conforme demonstrado na FIGURA 40, todas as amostras testadas, exibiram redução no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich. O MTX (Metotrexato) apontou uma redução do volume tumoral de 80,89%. Já os grupos tratados com FAC e VTX, apresentaram significativa redução do volume do tumor em até 76,57% e 79,52%, respectivamente. Extrato EBR, também apresentou redução do volume tumoral de 67,71%.

Ao final do experimento, avaliou-se o peso do tumor, no qual verificou-se que o grupo tratado com MTX demonstrou redução do peso do tumor de até 52,86%. Já os grupos tratados com FAC e VTX, demonstraram redução do peso do tumor de 45,95% e 42,14%, respectivamente. Os grupos que receberam o extrato EBR, demonstraram uma redução do peso tumoral de 35,24%.

FIGURA 40 - EFEITO DO TRATAMENTO COM OS EXTRATOS E VITEXINA DE *C. glandulosus* NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRLICH.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Efeito no volume do tumor sólido de Ehrlich (A) e peso do tumor (B). VEH (Água mineral); MTX (Metotrexato 2,5 mg/ kg i.p.); EBR (Extrato bruto 200 mg/kg v.o), FAC (Fração acetato de etila 100 mg/kg v.o.) e VTX (vitexina 2 mg/kg v.o). Dados expressos em média ± Erro padrão da média. As análises foram realizadas por meio do teste two-way ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. * p < 0,05 comparado ao VEH.

Os dados obtidos estão de acordo com os resultados do ensaio de viabilidade celular (MTT) com neuroblastoma humanos, o qual demonstrou redução significativa de células viáveis para as linhagens tumorais testadas. Além disso, a redução do volume e do peso do tumor, pelos extratos de *C. glandulosus*, corroboram com estudos de espécies de *Croton* que apresentaram atividade antitumoral em modelos de tumores de Ehrlich, como, *Croton polyandrous*; *Croton celtidifolius*; *Croton cajucara* e *Croton tiglium* (KIM, et al., 1994; GRYNBERG, et al., 1999; BISCARO, et al., 2013; MEIRELES, et al., 2016).

A capacidade de redução do volume e peso tumoral dos grupos tratados com EBR, pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos e flavonoides, no extrato. Estes compostos, juntamente com outros grupos químicos das plantas, como carotenoides, fitosteróis, biflavonoides, e outros fenóis, possuem propriedades antioxidantes, que podem desempenhar efeitos antitumorais (NATH et al., 2013).

Os resultados encontrados no ensaio antitumoral *in vivo*, demonstraram menor ação antitumoral do grupo tratado com EBR, em relação ao grupo tratado com FAC. Isso acontece devido à complexa composição química do EBR, na qual estão presentes diversos compostos químicos que atuam em sinergismo, para a ação de uma determinada atividade biológica (BHALLA, GUPTA e JAITAK, 2013).

A fração FAC demonstrou maior teor de compostos fenólicos (185 mg.EAG.g⁻¹) e maior concentração de vitexina (35,05 µg/mg) em relação ao EBR, e consequentemente, maior efeito antitumoral. Vários estudos demonstram a capacidade antitumoral da vitexina, sendo que este flavonoide, também é conhecido por suas propriedades antioxidantes (WANG, et al., 2014; GANESAN e XU, 2017; BHARDWAJ, et al., 2018; LIU, et al., 2018; WANG, et al., 2019; LIU, et al., 2019).

Em relação ao peso dos animais e peso relativo dos órgãos (TABELA 20), não observou-se alterações estatisticamente significativas, durante o período do teste. Na avaliação dos parâmetros bioquímicos (FIGURA 41), os valores de ALT para os grupos tratados com EBR, FAC e VTX, foram menores que o VEH. Os valores de AST, não demonstraram alterações entre os grupos tratados. Alguns tumores podem levar ao aumento de ALT, AST e ALP o que pode estar relacionado à danos hepáticos (GRIFFIN, et al., 1995; GUPTA, et al., 2004).

TABELA 20 - PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TUMOR DE EHRlich.

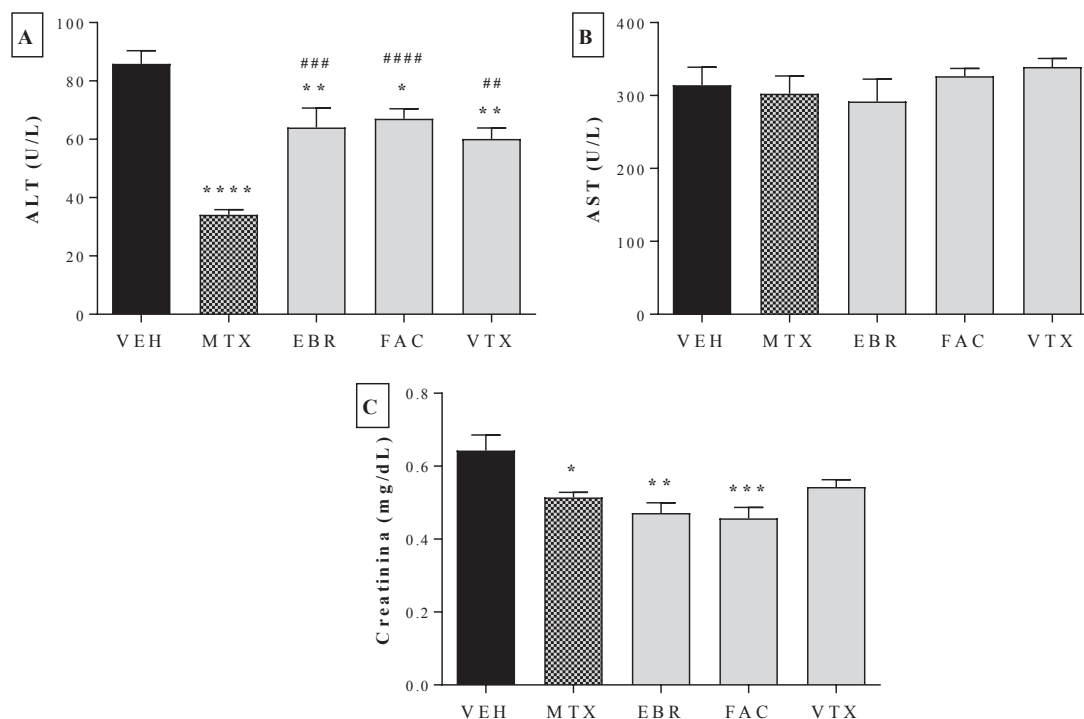
ÓRGÃOS	VEH	MTX	EBR	FAC	VTX
Fígado	5,64±0,51	5,55±0,33	5,12±0,49	5,08±0,20	5,21±0,51
Rins	1,14±0,05	1,05±0,07	1,21±0,05	1,17±0,05	1,22±0,35
Baço	0,82±0,24	0,60±0,07	0,72±0,23	0,79±0,27	0,88±0,24
Pulmão	0,68±0,03	0,61±0,07	0,75±0,07	0,74±0,06	0,76±0,06

FONTE: O autor (2020).

NOTA: VEH (Água mineral); MTX (Metotrexato 2,5 mg/ kg i.p.); EBR (Extrato bruto 200 mg/kg v.o), FAC (Fração acetato de etila 100 mg/kg v.o.) e VTX (vitexina 2 mg/kg v.o). Dados expressos em média ± Erro padrão da média. As análises foram realizadas por meio do teste one-way ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Verificou-se que os grupos tratados com MTX, EBR, FAC e VTX, não demonstraram danos hepáticos significativos, além disso, segundo Mahmoud et al., (2015), a redução plasmática de ALT, AST e ALP, podem indicar proteção hepática. Dessa forma, alterações nos níveis das enzimas hepáticas, podem ser interpretadas como consequência de danos hepáticos ou mudança de permeabilidade das membranas, que sugerem dano hepático severo causado por tumor sólido de Ehrlich (ALDUBAYAN et al., 2019).

FIGURA 41 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS COM EHRlich TRATADOS E NÃO TRATADOS.



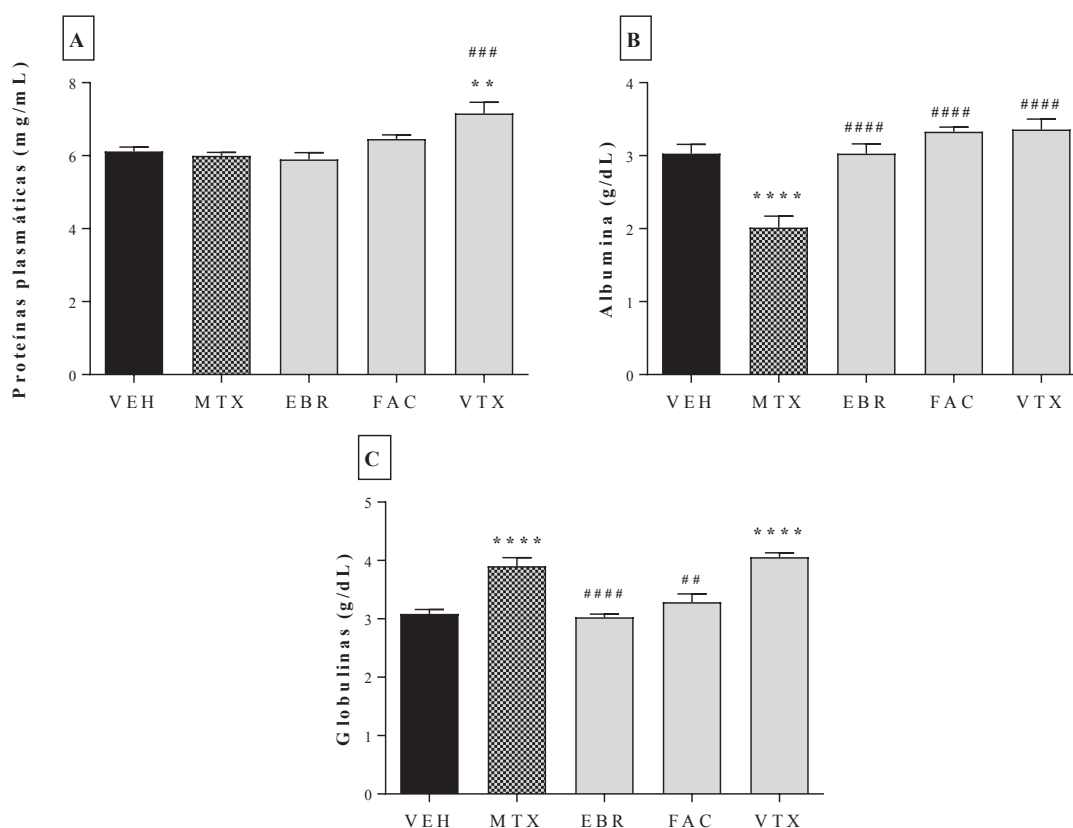
FONTE: O autor (2020).

NOTA: VEH (Água mineral); MTX (Metotrexato 2,5 mg/ kg i.p.); EBR (Extrato bruto 200 mg/kg v.o), FAC (Fração acetato de etila 100 mg/kg v.o.) e VTX (vitexina 2 mg/kg v.o). Dados expressos em média ± Erro padrão da média. * diferença estatística em relação ao VEH. # diferença estatística em relação ao MTX avaliado por ANOVA seguido do post-hoc de Tukey.

A creatinina foi reduzida nos grupos tratados com MTX, EBR, e FAC, quando comparado ao grupo VEH. Em relação às proteínas plasmáticas, observou-se que apenas os grupos tratados com VTX demonstraram aumento da concentração, quando comparada ao VEH e ao MTX.

O tumor causa redução das proteínas plasmáticas e da relação albumina/ globulina (FIGURA 42) o que está relacionado à necrose hepática (GARRISON, et al., 1987; KAPOOR et al., 2014). O aumento dos níveis de ALP, ALT, e AST concomitante à redução das proteínas plasmáticas, é indicativo de toxicidade hepática. Pois a albumina é uma das mais abundantes proteínas no plasma, sendo sintetizada no fígado, logo é usualmente utilizada como marcador da função hepática (SARAVANAN; VISWANATHAN e PUGALENDI, 2006).

FIGURA 42 - PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE CAMUNDONGOS COM EHRlich TRATADOS E NÃO TRATADOS.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: VEH (Água mineral); MTX (Metotrexato 2,5 mg/ kg i.p.); EBR (Extrato bruto 200 mg/kg v.o), FAC (Fração acetato de etila 100 mg/kg v.o.) e VTX (vitexina 2 mg/kg v.o). Dados expressos em média \pm Erro padrão da média. * diferença estatística em relação ao VEH. # diferença estatística em relação ao MTX avaliado por ANOVA seguido do post-hoc de Tukey.

Verificou-se a redução da albumina nos grupos tratados com MTX, porém os grupos que receberam EBR, FAC e VTX, não demonstraram diferença significativa em relação ao VEH. Em relação à globulina, os grupos que receberam MTX e VTX, demonstraram aumento da concentração desta proteína, quando comparada ao VEH.

Em relação aos parâmetros hematológicos (TABELA 21), o grupo VEH demonstrou redução dos níveis de leucócitos e linfócitos, aumento de granulócitos e redução das plaquetas. Os grupos que receberam os tratamentos não demonstraram nenhuma alteração hematológica. O tumor é capaz de elevar a contagem de leucócitos e granulócitos, que pode estar relacionado ao estresse agudo causado pela resposta inflamatória (HASHIM; MOHAMED; MAGDA, 2004).

TABELA 21 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO TUMOR DE EHRlich TRATADOS E NÃO TRATADOS.

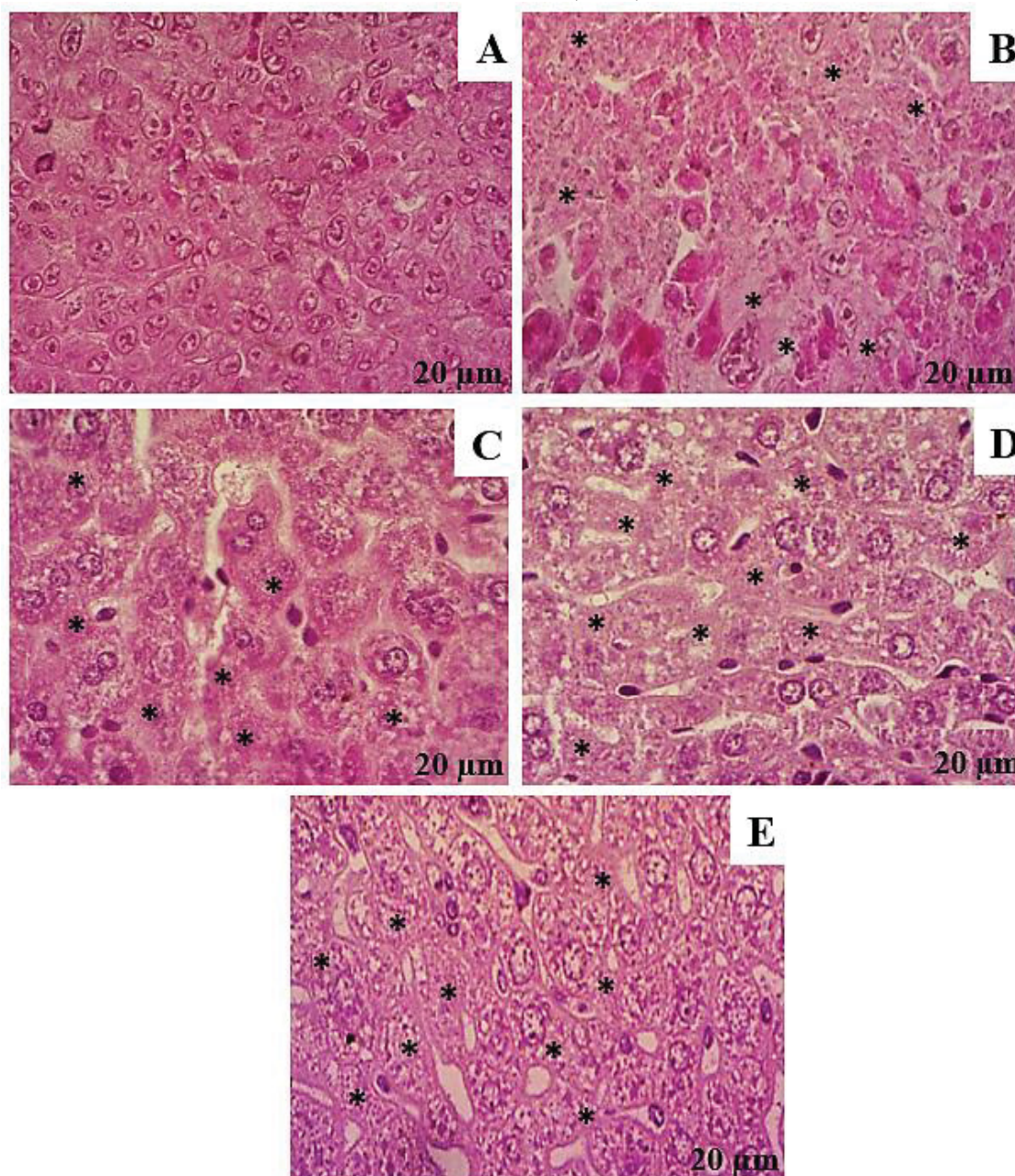
GRUPO	VEH	MTX	EBR	FAC	VTX
WBC	3,51±1,09	6,53±2,38 ^a	5,97±1,63 ^a	6,60±1,61 ^a	6,97 ±2,09 ^a
LINFO%	55,60±2,75	66,81±11,85 ^a	67,44±5,14 ^a	67,54±4,89 ^a	66,36±4,67 ^a
MONO%	4,70±1,19	5,89±1,51	5,51±2,22	5,96±1,59	4,94±1,58
GRAN%	41,30±4,41	27,51±10,68 ^a	28,80±5,62 ^a	28,94±3,68 ^a	29,53±4,75 ^a
RBC	9,13±0,43	8,95±0,47	9,06±5,30	9,07±0,32	9,28±0,41
HB	12,63±1,62	12,01±0,63	12,66±0,58	12,94±0,57	13,11±0,50
HCT	40,79±5,25	39,54±2,18	40,80±1,77	40,48±2,02	40,96±2,32
MCV	44,74±0,94	44,24±1,22	45,17±0,93	44,72±2,05	44,20±1,35
MCH	13,80±0,26	13,37±0,21	13,93±0,48	14,24±0,69	14,11±0,50
MCHC	30,90±0,81	30,36±0,80	31,10±0,95	31,92±0,82	32,01±1,07
RDW	14,14±1,04	15,97±0,55	14,29±1,13	13,92±1,75	14,36±1,51
PLAQ	261,14±69,44	384,14±78,21 ^a	375,71±86,25 ^a	370,80±54,09 ^a	365,14±34,84 ^a

FONTE: O autor (2020).

NOTA: WBC: Leucócitos totais; LINFO%: % Linfócitos; MONO%: % Monócitos; GRAN%: % Granulócitos; RBC: Eritrócitos; HB: Hemoglobina; HCT: Hematócrito; MCV: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; MCHC: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos; PLAQ: Plaquetas. VEH (Água mineral); MTX (Metotrexato 2,5 mg/ kg i.p.); EBR (Extrato bruto 200 mg/kg v.o), FAC (Fração acetato de etila 100 mg/kg v.o.) e VTX (Vitexina 2 mg/kg v.o). Dados expressos em média ± Desvio Padrão. As análises foram realizadas por meio do teste one-way ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. ^a p < 0,05 comparado ao VEH.

Os resultados das análises histológicas dos tumores estão apresentados na FIGURA 43.

FIGURA 43 - AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TUMOR EHRlich EM CAMUNDONGOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM MTX, EBR, FAC E VTX.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: A: VEH (Água mineral); B: MTX (Metotrexato 2,5 mg/ kg i.p.); C: EBR (Extrato bruto 200 mg/kg v.o); D: FAC (Fração acetato de etila 100 mg/kg v.o.) e E: VTX (Vitexina 2 mg/kg v.o). * Áreas de necrose.

Os resultados demonstraram regiões de alta proliferação celular no grupo VEH. Já os grupos tratados com MTX, EBR, FAC e VTX apresentaram redução da proliferação celular, com áreas de necrose, confirmando a capacidade antitumoral dos extratos e da vitexina. Estes resultados corroboram com outros estudos com modelo experimental de tumor de Ehrlich com produtos naturais. (SOMASAGARA, et al., 2012; ADAMI, et al., 2018). Segundo

Miranda-VILELA et al. (2011) as regiões mais periféricas apresentam áreas de proliferação celular diferenciada e as regiões centrais, áreas de necrose.

4.9.2 Avaliação da atividade hepatoprotetora e efeito sobre o estresse oxidativo induzido por CCl₄ em camundongos *Swiss*

A indução da toxicidade hepática pela administração do agente hepatotóxico CCl₄ causou aumento plasmático das enzimas ALT (1475,60 %), AST (472,07 %) e ALP (492,28 %) no grupo controle (VEH), comparado ao NAIVE. O grupo tratado NAC, não apresentou diferença significativa no teor de ALT. No entanto, os tratamentos EBR, FAC e VTX, demonstraram aumento de ALT quando comparado ao NAIVE, porém, os valores foram menores que o grupo controle VEH. O teor de AST, foi elevado no grupo controle VEH e no grupo tratado com NAC+. Os grupos tratados com EBR, FAC e VTX, demonstraram aumento no teor de AST quando comparado ao NAIVE, no entanto, o valor encontrado foi menor do que o obtido no grupo VEH, tratado apenas com CCl₄.

A análise de ALP demonstrou aumento da ação enzimática para os grupos tratados com CCl₄ (VEH) e VTX. Apesar do aumento do teor plasmático de ALP, nos grupos tratados com EBR e FAC, os valores encontrados foram menores que o grupo VEH. A administração de EBR e FAC reduziu a atividade das três enzimas hepáticas testadas (TABELA 22), sugerindo que houve reparo do dano tecidual ocasionado pelo agente hepatotóxico. A VTX foi capaz de reduzir a ação enzimática apenas para ALT e AST.

TABELA 22 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TRANSAMINASE DE ALANINA SÉRICA (ALT), ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST) E FOSFATASE ALCALINA (ALP), TEOR DE CREATININA E GLICOSE EM CAMUNDONGOS INDUZIDOS E NÃO INDUZIDOS A HEPATOTOXICIDADE POR CCl₄.

GRUPO	ALT	AST	ALP	Creatinina	Glicose
VEH	710,08±24,88 ^b	558,56±19,19 ^b	161,47±30,75 ^b	0,35±0,22	76,80±24,88
NAIVE	48,12±22,16 ^a	118,32±32,39 ^a	32,80±20,95 ^a	0,28±0,13	68,40±8,87
NAC	67,50±36,75 ^a	129,40±23,56 ^a	99,41±16,49 ^{a,b}	0,36±0,18	67,44±20,30
NAC+	353,90±27,85 ^{a,b}	416,38±6,66 ^b	88,30±28,72 ^{a,b}	0,38±0,04	62,20±44,33
EBR	405,87±29,26 ^{a,b}	339,32±46,89 ^{a,b}	86,20±13,96 ^{a,b}	0,31±0,20	66,59±15,02
FAC	415,95±21,49 ^{a,b}	302,20±40,72 ^{a,b}	86,28±18,54 ^{a,b}	0,36±0,27	87,40±16,51
VTX	461,70±12,19 ^{a,b}	310,67±42,77 ^{a,b}	116,24±24,12 ^b	0,37±0,12	85,94±10,94

FONTE: O autor (2020).

NOTA: VEH (Água ultrapura + CCl₄ 2%, 5 mL/kg), NAIVE (Água mineral), NAC (N-acetilcisteína 100 mg/Kg), NAC+ (N-acetilcisteína 100 mg/Kg + CCl₄), EBR (Extrato bruto 350 mg/kg + CCl₄), FAC (Fração acetato de etila 350 mg/kg + CCl₄) e VTX (vitexina 3,5 mg/kg + CCl₄). Dados expressos em média aritmética ± Desvio padrão. As análises foram realizadas por meio do teste one-way ANOVA seguido de post-hoc de Tukey.

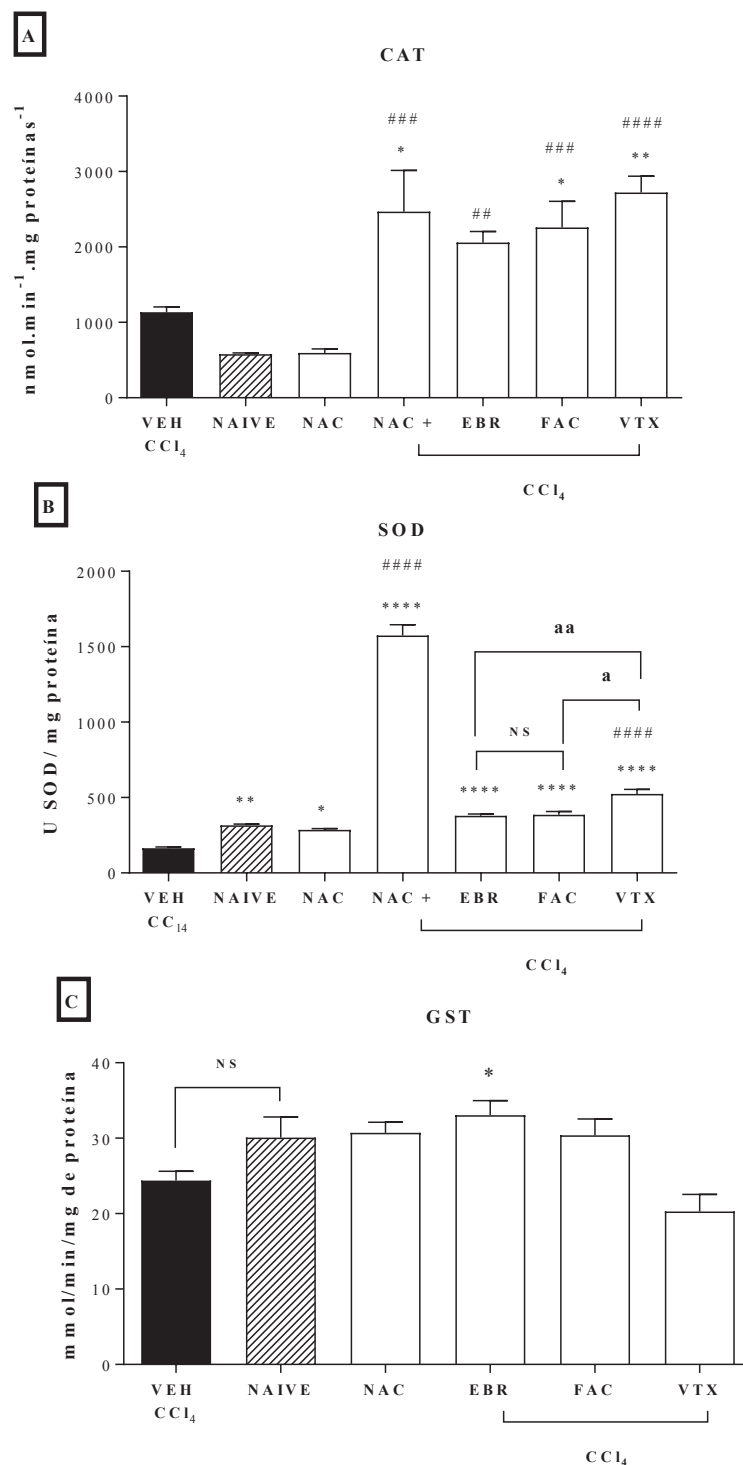
^a comparado ao grupo VEH (p<0,05). ^b comparado ao grupo NAIVE (p <0,05).

Estes resultados demonstraram que os tratamentos com EBR, FAC e VTX reduziram de forma significativa a atividade das enzimas hepáticas ALT, ALP e AST presentes no plasma, sugerindo proteção contra os danos hepáticos induzidos pelo CCl₄, visto que o aumento destas enzimas plasmáticas pode indicar dano celular e perda da função das membranas do fígado (JAIN; ARGAL, 2014). Estes dados corroboram com os estudos de hepatoproteção feitos com *C. bonplandianus* Baill, *C. sparciflorus* e *C. oblongifolius* (DUTTA et al., 2018; SANTHI et al., 2014; AHMED et al., 2002)

Foram determinados parâmetros bioquímicos, como creatinina e glicose (TABELA 22). Os níveis de Creatinina e glicose não demonstram alterações em nenhum dos tratamentos, mesmo com indução de hepatotoxicidade. Os grupos tratados com EBR, FAC e VTX mantiveram os valores destes parâmetros bioquímicos, estatisticamente dentro dos valores basais encontrados no grupo NAIVE. Os valores encontrados de creatinina e glicose, permaneceram inalterados no experimento. Estes resultados demonstram que os extratos e o flavonoide isolado de *C. glandulosus*, não resultam em deficiência na taxa de filtração glomerular dos animais, estimado pelo nível plasmáticos de creatinina e também não afeta a glicemia normal dos animais.

O tratamento com CCl₄ não alterou a atividade de CAT (FIGURA 44), no entanto as amostras EBR, FAC, VTX e NAC⁺ demonstraram aumento na atividade enzimática, quando comparado ao grupo NAIVE. A hepatotoxicidade induzida pelo CCl₄, reduziu a atividade de SOD quando comparada ao NAIVE. Os grupos tratados com NAC⁺ e VTX, demonstraram aumento significativo de SOD, em relação ao NAIVE. Os grupos tratados com EBR e FAC, mantiveram a atividade enzimática de SOD, normal e estatisticamente igual ao grupo NAIVE, porém os valores de atividade de SOD, foram maiores que o grupo VEH. O grupo VEH não demonstrou redução da atividade de GST, no entanto, o grupo tratado com EBR, apresentou aumento da atividade enzimática quando comparado ao grupo NAIVE.

FIGURA 44 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CAT (A), SOD (B) E GST (C) NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS



FONTE: O autor (2020).

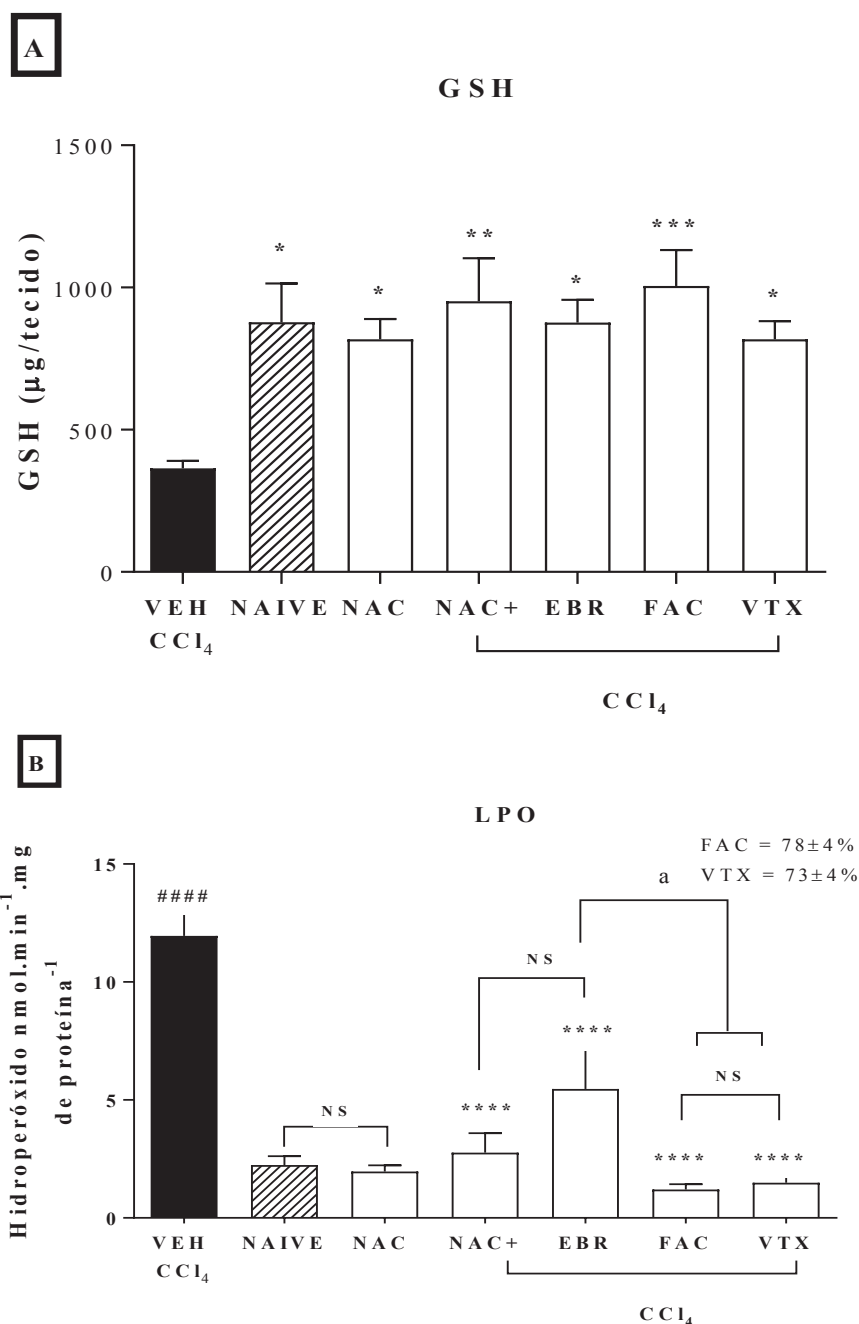
NOTA: Grupos: VEH (Água ultrapura + CCl₄ 2%, 5 mL/kg), NAIVE (Água mineral), NAC (N-acetilcisteína 100 mg/Kg), NAC+ (N-acetilcisteína 100 mg/Kg + CCl₄), EBR (Extrato bruto 350 mg/kg + CCl₄), FAC (Fração acetato de etila 350 mg/kg + CCl₄) e VTX (vitexina 3,5 mg/kg + CCl₄). Dados expressos em média ± Erro padrão. As análises foram realizadas por meio do teste one-way ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 comparado ao NAIVE. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 comparado ao VEH. ^a p < 0,05; ^{aa} p < 0,01; comparado as amostras. ^{NS} = Não houve diferença estatística.

A hepatotoxicidade induzida pelo CCl_4 também reduziu a atividade de enzimas antioxidantes endógenas, como SOD e CAT. Entretanto, com a administração do EBR, FAC e VTX, a atividade dessas enzimas foi aumentada, o que pode indicar a redução da produção dos radicais superóxido ($\cdot\text{O}_2$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2^-$), que são convertidos pela SOD em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), evitando o dano celular (IGHODARO; AKINLOYE, 2017). O aumento da atividade de CAT, demonstrou efeito hepatoprotetor das amostras, evitando a formação de radicais livres. Isso ocorre provavelmente por um mecanismo de equilíbrio, pois a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela SOD, quando em excesso, pode causar toxicidade nos tecidos e nas células, entretanto, a atividade da CAT neutraliza os efeitos do estresse oxidativo celular, metabolizando o H_2O_2 em O_2 e H_2O (IGHODARO; AKINLOYE, 2017). A VTX demonstrou maior potencial de estímulo da atividade de SOD e CAT, quando comparado ao EBR e FAC.

Apesar da redução da GST pela VTX, as amostras EBR e FAC, estimularam a atividade da GST, o que pode indicar que os extratos ativaram a fase II de metabolização de camundongos tratados com o CCl_4 , pois a GST representa parte da resposta adaptativa e atua protegendo o organismo contra substratos eletrofílicos, eliminando peróxidos, epóxidos, compostos carbonílicos tóxicos e substâncias oriundas do estresse oxidativo celular no fígado (HAYES; PULFORD, 1995; LÜ et al.; 2010). Essa diferença entre os extratos e o flavonoide isolado, pode estar relacionada com o sinergismo dos compostos fenólicos presentes nos extratos, que atuam de forma a estimular a produção de enzimas antioxidantes, bem como reduzir a produção de radicais livres por meio de sua capacidade antioxidante.

A administração do CCl_4 reduziu os níveis de GSH total no homogenato do fígado, e os resultados encontrados neste trabalho, evidenciam significativa inibição da depleção de GSH nos grupos tratados com EBR, FAC e VTX quando comparado ao grupo controle (VEH) (FIGURA 45).

FIGURA 45 - NÍVEL DE GSH (A) E LPO (B) NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Grupos: VEH (Água ultrapura + CCl₄ 2%, 5 mL/kg), NAIVE (Água mineral), NAC (N-acetilcisteína 100 mg/Kg), NAC+ (N-acetilcisteína 100 mg/Kg + CCl₄), EBR (Extrato bruto 350 mg/kg + CCl₄), FAC (Fração acetato de etila 350 mg/kg + CCl₄) e VTX (vitexina 3,5 mg/kg + CCl₄). Dados expressos em média ± Erro padrão. As análises foram realizadas por meio do teste ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 comparado ao NAIVE. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 comparado ao VEH. ^ap < 0,05; ^{aa}p < 0,01; comparado as amostras. ^{NS}=Não houve diferença estatística.

A administração de CCl₄ pode induzir à necrose dos hepatócitos e à redução do nível de GSH (RECKNAGEL et al., 1989). No entanto nota-se um efeito hepatoprotetor

significativo dos extratos e do flavonoide isolado de *C. glandulosus*. Estes resultados indicam que o aumento do teor do GSH pode ocorrer devido à ação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante, que previne a formação dos radicais livres $\cdot\text{CCl}_3$ e $\cdot\text{Cl}$, inibindo a etapa de propagação da peroxidação lipídica, que é o mesmo mecanismo observado com a cistamina (agente hepatoprotetor) (DE FERREYRA et al., 1974; SURAI, 2015). Observou-se que o grupo tratado com FAC apresentou aumento do teor de GSH quando comparado com o grupo NAC+, que contém o fármaco hepatoprotetor de referência. Esta fração conforme demonstrado no ensaio de TPC, possui maior teor de compostos fenólicos, que podem atuar em sinergismo com outras substâncias antioxidantes e consequentemente, impedir a propagação de peroxidação lipídica e a redução do GSH.

O grupo tratado com CCl_4 (VEH), apresentou significativo aumento da peroxidação lipídica (LPO), já os grupos tratados com EBR, FAC e VTX, demonstraram significativa redução da LPO (FIGURA 45). Os tratamentos FAC e VTX, apresentaram uma redução da LPO de 78 e 73 %, respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com EBR. Entretanto, o grupo EBR não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo tratado NAC+. Em conjunto, este estudo evidenciou-se que as frações de *C. glandulosus* foram capazes de atuar como antioxidantes e estimulantes da atividade de enzimas antioxidantes endógenas. A presença de compostos fenólicos pode ser responsável pela ação antioxidante da espécie, que pode ser evidenciada pela maior redução da LPO pelas amostras com maiores valores de TPC. Portanto, os resultados indicam que este pode ser um dos mecanismos envolvidos na proteção da membrana hepatocelular. Onde o aumento das enzimas antioxidantes nos animais expostos ao CCl_4 , inibiram a reação de peroxidação, induzida pela ligação dos radicais livres aos ácidos graxos poli-insaturados da membrana fosfolipídica (DE GROOT et al., 1988).

A hepatotoxicidade causada pelo CCl_4 , aumentou a expressão de WBC, granulócitos, MCV e MCH, reduzindo a quantidade de plaquetas, quando comparado aos valores basais estimados (NAIVE). O EBR demonstrou aumento significativo da expressão de WBC, quando comparado ao VEH. No entanto, o FAC e VTX, reduziram a expressão de WBC. Além disso, a VTX demonstrou aumento da expressão de granulócitos (TABELA 23).

Para o parâmetro de RBC, os tratamentos FAC e VTX, demonstraram redução celular, no entanto, o mesmo foi observado no grupo tratado com o fármaco controle (NAC+). O EBR manteve a expressão de RBC normal, comparado ao efeito basal, observado no grupo NAIVE. Os grupos tratados com o fármaco N-acetilcisteína, CCl_4 , EBR, FAC e VTX, demonstraram redução de plaquetas quando comparado ao estado basal (NAIVE).

TABELA 23 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM CCl₄.

GRUPO	VEH	NAIVE	NAC	NAC+	EBR	FAC	VTX
WBC	6,21±2,61 ^c	4,45±0,97 ^b	3,41±1,39 ^b	4,24±0,83 ^b	7,86±2,68 ^d	3,01±1,31 ^a	1,87±1,22 ^a
LINFO%	55,70±12,61 ^a	69,51±13,83 ^a	60,23±9,44 ^a	51,40±16,48 ^a	66,73±9,51 ^a	54,87±15,70 ^a	50,20±8,99 ^a
MONO%	7,41±2,37 ^c	4,58±1,87 ^b	4,98±0,46 ^b	4,08±0,30 ^a	4,18±0,97 ^a	4,30±0,34 ^b	3,67±1,22 ^a
GRAN%	37,46±11,22 ^b	25,90±13,19 ^a	34,79±9,25 ^b	43,86±14,69 ^b	28,51±8,93 ^b	39,37±13,82 ^b	46,13±8,34 ^c
RBC	8,95±0,43 ^b	8,22±0,72 ^b	8,43±1,91 ^b	5,22±1,15 ^a	8,48±1,23 ^b	4,85±1,78 ^a	3,75±0,80 ^a
HB	12,87±0,43 ^b	11,41±0,63 ^b	11,57±2,68 ^b	6,72±3,45 ^a	11,7±1,84 ^b	6,75±2,86 ^a	4,85±1,01 ^a
HCT	39,57±2,10 ^b	35,22±2,69 ^b	40,88±8,75 ^b	22,94±9,97 ^a	40,10±5,05 ^b	25,01±9,51 ^a	20,00±3,67 ^a
MCV	44,31±1,93 ^b	13,9±0,76 ^a	13,65±0,77 ^a	12,76±0,75 ^a	13,72±0,76 ^a	13,70±1,16 ^a	12,88±0,17 ^a
MCH	14,34±0,39 ^c	13,90±0,76 ^b	13,65±0,77 ^b	12,76±1,06 ^a	13,72±0,76 ^b	13,70±1,16 ^b	12,88±0,17 ^a
RDW	14,54±0,92 ^a	13,37±1,06 ^a	14,34±1,17 ^a	14,10±0,88 ^a	14,57±1,17 ^a	13,92±0,69 ^a	14,17±0,72 ^a
PLAQ	331,42±108,40 ^b	507,14±51,61 ^d	325,71±123,80 ^b	221,40±101,49 ^a	391,66±153,26 ^c	285,00±89,31 ^b	220,16±69,75 ^a

FONTE: O autor (2020).

NOTA: WBC: Leucócitos totais; LINFO%: % Linfócitos; MONO%: % Monócitos; GRAN%: % Granulócitos; RBC: Eritrócitos; HB: Hemoglobina; HCT: Hematócrito; MCV: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; MCHC: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos; PLAQ: Plaquetas. Grupos: VEH (água ultrapura + CCl₄ 2%, 5 mL/kg), NAIVE (Água mineral), NAC (N-acetilcisteína 100 mg/kg), NAC+ (N-acetilcisteína 100 mg/kg + CCl₄), EBR (Extrato bruto 350 mg/kg + CCl₄), FAC (Fração acetato de etila 350 mg/kg + CCl₄) e VTX (vitexina 3,5 mg/kg + CCl₄). Dados expressos em média ± Erro padrão. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância pelo teste one-way ANOVA seguida de post-hoc de Tukey.

A hepatotoxicidade causada pelo CCl_4 gerou diversas alterações hematológicas, no entanto, com a administração do EBR, não se observou aumento de granulócitos, MCV e MCH. Além disso, o EBR não apresentou alteração do RBC, como observado no grupo controle NAC+. Porém, observou-se redução do parâmetro RBC nos grupos tratados com FAC e VTX. A N-acetilcisteína (NAC) é um fármaco comercializado, com potente ação antioxidante e no estudo de Valadares de Moraes et al. (2008) a dose que não apresentou alterações hematológicas foi abaixo de 75 mg/Kg, valor inferior à dose utilizada (100 mg/kg) neste ensaio. Quando administrada com a dapsona, observou-se efeito sinérgico e pró-oxidante da NAC, que resultou na redução de RBC (Valadares de Moraes et al., 2008). Portanto, é possível que o EBR e VTX tiveram comportamento semelhante à N-acetilcisteína.

Observou-se também que a administração do N-acetilcisteína e do CCl_4 , levou à redução no número de plaquetas. No entanto, este efeito foi menor nos grupos tratados com EBR, FAC e VTX, quando comparados ao controle VEH, o que pode significar ação antioxidante dessas amostras. Apesar das alterações hematológicas observadas para FAC e VTX, não houve toxicidade significativa no sistema hematológico causado pelo extrato EBR. Além disso, o grupo tratado com N-acetilcisteína também apresentou efeitos adversos.

A administração do CCl_4 , independente do tratamento prévio, resultou no aumento do peso relativo do fígado, rins, baço e pulmões dos camundongos, quando comparado ao controle basal (NAIVE). Entretanto, observou-se que a administração da N-acetilcisteína (NAC+), também resultou no aumento significativo dos rins. Os tratamentos com FAC e VTX, demonstraram aumento relativo do peso do baço (TABELA 24).

TABELA 24 - PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM CCl_4 .

Órgãos	VEH	NAIVE	NAC	NAC+	EBR	FAC	VTX
Fígado	7,16±0,70 ^b	4,42±0,44 ^a	4,87±0,73 ^a	7,32±0,62 ^b	6,88±0,54 ^b	7,37±0,67 ^b	7,99±1,19 ^b
Rins	1,45±0,19 ^b	1,36±0,16 ^a	1,38±0,19	1,66±0,27 ^b	1,62±0,17	1,57±0,11	1,47±0,35
Baço	0,35±0,04	0,28±0,07	0,32±0,05	0,34±0,06	0,36±0,09	0,46±0,11 ^b	0,47±0,06 ^{a,b}
Pulmão	0,70±0,08 ^b	0,58±0,07 ^a	0,61±0,08	0,63±0,06	0,61±0,03	0,66±0,07	0,66±0,07

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Grupos: VEH (Água ultrapura + CCl_4 2%, 5 mL/kg), NAIVE (Água mineral), NAC (N-acetilcisteína 100 mg/Kg), NAC+ (N-acetilcisteína 100 mg/Kg + CCl_4), EBR (Extrato bruto 350 mg/kg + CCl_4), FAC (Fração acetato de etila 350 mg/kg + CCl_4) e VTX (vitexina 3,5 mg/kg + CCl_4). Dados expressos em média aritmética ± Desvio padrão. As análises foram realizadas por meio do teste one-way ANOVA seguido de post-hoc de Tukey.

^a comparado ao grupo VEH (p<0,05). ^b comparado ao grupo NAIVE (p <0,05).

Após análise histológica do fígado dos animais, observou-se a presença de necrose acentuada em torno da veia centrolobular, no grupo tratado com CCl_4 . Outros estudos demonstraram o mesmo padrão de necrose, com degeneração e desarranjo dos hepatócitos, no

grupo VEH, além da presença de células inflamatórias, como linfócitos, congestão vascular, cistos gordurosos e hepatócitos em forma de balão (QUERESHI et al., 2007; JAIN; ARGAL, 2014; DUTA et al., 2018). Entretanto, observou-se nas análises histológicas, redução do campo de necrose, nos grupos tratados com EBR, FAC e VTX. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com outras espécies de *Croton*, que demonstraram regulação da lesão, similar ao fármaco hepatoprotetor (DUTA et al., 2018)

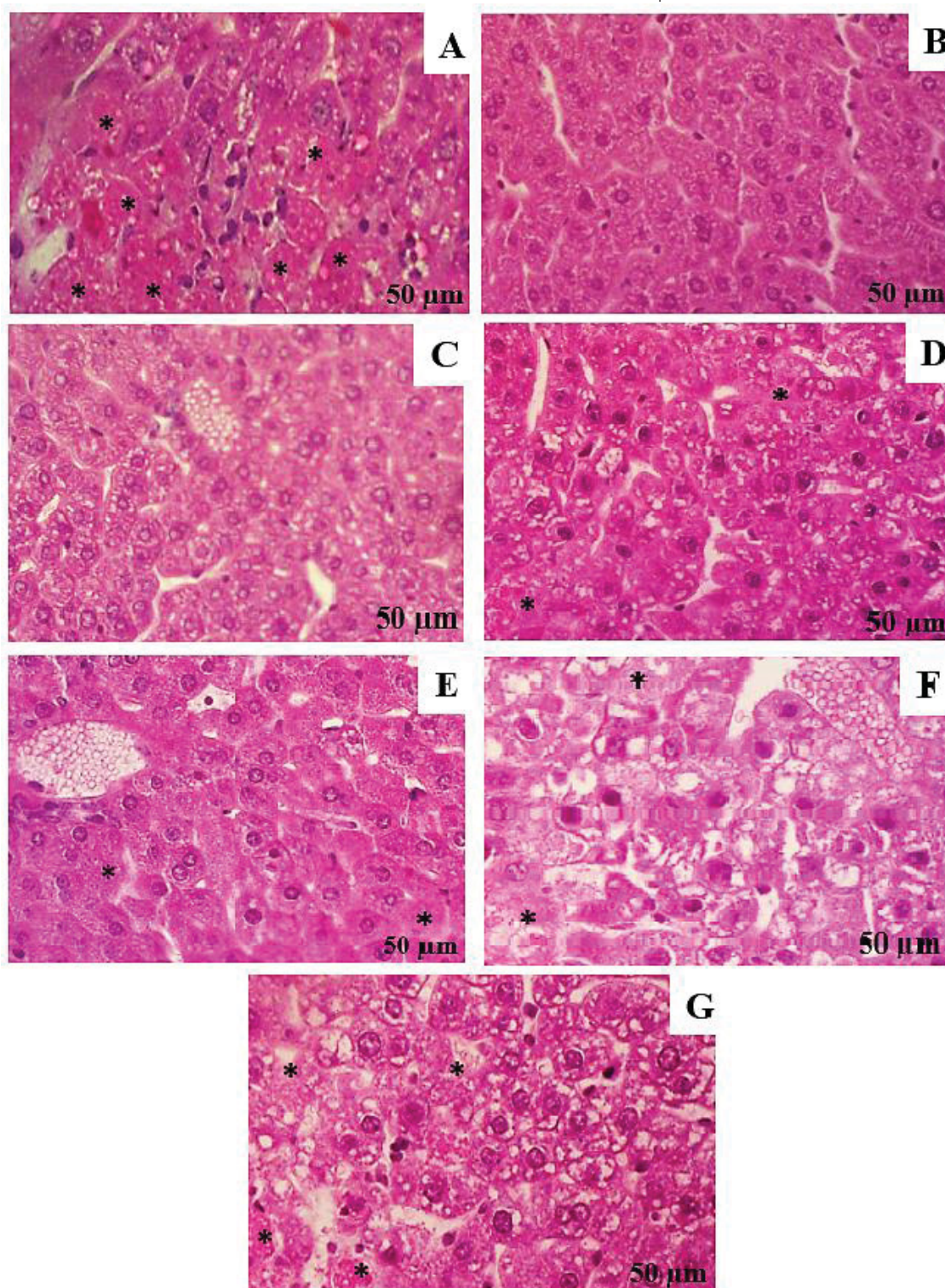
Os resultados da análise histológica do fígado, demonstra que o VEH apresentou um alto nível de necrose celular. O grupo NAIVE e tratado com NAC, não demonstraram alterações histológicas (FIGURA 46).

Os grupos tratados com NAC+, EBR, FAC e VTX, demonstraram significativa redução de necrose hepatocelular. Estes resultados corroboram com outros estudos de produtos naturais, que demonstraram efeito hepatoprotetor e redução da necrose dos hepatócitos (SHARMA e SHUKLA 2011; SAHREEN, KHAN e KHAN, 2011; HUO et al., 2011).

Apesar dos efeitos tóxicos moderados da fração FAC e do flavonoide VTX, estes compostos podem ser utilizados como modelo protótipo de fármacos em estudos de modificação estrutura-resposta, para reduzir os efeitos prejudiciais das amostras nos eritrócitos. Além disso, sugere-se que o efeito toxicológico possa ter ocorrido por consequência de uma resposta aguda, devido à dose utilizada. Já que no ensaio antitumoral (que durou 21 dias), os extratos e a VTX, foram avaliados em concentrações menores, não demonstrando alterações toxicológicas nos animais.

O extrato bruto (EBR), demonstrou melhor efeito hepatoprotetor, pois além de reduzir o estresse oxidativo e peroxidação lipídica induzida pelo CCl₄, esta amostra não demonstrou efeitos deletérios nos animais, durante o experimento. Isso pode ser resultado de compostos antioxidantes, que atuam em sinergismo e antagonismo na matéria complexa do extrato bruto, favorecendo as atividades farmacológicas, e em contrapartida, evitando os efeitos tóxicos pró-oxidantes (GEY, 1998).

FIGURA 46 - ANÁLISES HISTOLÓGICAS DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS NORMAIS E INDUZIDOS À HEPATOTOXICIDADE COM CCl_4



FONTE: O autor (2020).

NOTA: A: VEH (Água ultrapura + CCl_4 2%, 5 mL/kg), B: NAIVE (Água mineral), C: NAC (N-acetilcisteína 100 mg/Kg), D: NAC+ (N-acetilcisteína 100 mg/Kg + CCl_4), E: EBR (Extrato bruto 350 mg/kg + CCl_4), F: FAC (Fração acetato de etila 350 mg/kg + CCl_4) e G: VTX (vitexina 3,5 mg/kg + CCl_4). * Áreas de necrose.

Neste ensaio pode-se verificar o efeito hepatoprotetor e antioxidante do extrato bruto, fração acetato de etila e do flavonoide vitexina, de *Croton glandulosus*, pode estar relacionado

com a redução da peroxidação lipídica de membrana. Considerando que as opções de tratamento para hepatopatias demonstram benefícios terapêuticos limitados e algumas complicações (MIHAILOVIC et al., 2012; CENGIZ et al., 2012), o estudo dos extratos de *C. glandulosus* e do flavonoide vitexina isolado da espécie, abre perspectivas para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos eficazes e seguros.

5. CONCLUSÕES

O material vegetal seco das partes aéreas de *C. glandulosus*, apresentou o teor de umidade e cinzas dentro dos limites permitidos pela farmacopeia brasileira. No ensaio de termogravimetria, observou-se que o processo de degradação dos compostos bioativos iniciou-se apenas a 188 °C. A partir do material vegetal seco, obteve-se 0,12% de óleo essencial, o qual apresentou predominância de sesquiterpenos em sua composição química, sendo que os constituintes químicos majoritários encontrados, foram os sesquiterpenos β -cariofileno, Bicyclgermacreno e o γ -amorfeno.

Nos ensaios biológicos, o óleo essencial de *C. glandulosus* ausência de toxicidade aos náuplios de *A. salina* e ausência de capacidade hemolítica. Em relação à atividade alelopática, o óleo essencial não afetou a capacidade de germinação de sementes de *Lactuca sativa*. No entanto, houve redução do índice de germinação e inibição do crescimento do hipocótilo e da radícula. Dessa forma, o óleo essencial apresentou-se promissor no desenvolvimento de bioherbicidas. Além disso, o óleo essencial demonstrou propriedades antioxidantes pelo método de fosfomolibdênio, podendo ser explorado pela indústria farmacêutica e alimentícia.

A partir das partes aéreas de *C. glandulosus*, obteve-se também, o extrato etanólico bruto (EBR), fração hexânica (HEX), clorofórmica (CLO), acetato de etila (FAC) e residual (RES). Em estudos químicos do extrato, frações observou-se a presença de taninos, compostos fenólicos, flavonoides, esteroides, triterpenos e cumarinas. Não verificou-se a presença de alcaloides em nenhuma das amostras. Em coluna cromatográfica aberta, foi possível isolar um composto, identificado por RMN ^1H e RMN ^{13}C , conhecido como apigenina 8-C-glicosídeo ou Vitexina, classificado como uma flavona. Em análise quantitativa por CLAE-UV, determinou-se o teor da Vitexina no extrato e frações, no qual a fração FAC e o extrato EBR, apresentaram o maior teor do flavonoide.

Em testes de toxicidade preliminar, verificou-se que os extratos e frações de *C. glandulosus* não apresentaram letalidade para os náuplios de *Artemia salina*. Em ensaio de capacidade hemolítica, a fração HEX atingiu a maior porcentagem hemolítica (46,25%) e os demais extratos apresentaram capacidade hemolítica abaixo de 15%. Além disso, em baixas concentrações o extrato e frações, demonstraram capacidade hemolítica, estatisticamente inferior aos controles negativos. O que foi verificado por meio do ensaio de capacidade anti-hemolítica, no qual evidenciou-se o efeito protetor da fração FAC, quando em baixas concentrações. Devido ao efeito hemolítico da fração HEX, este foi avaliado quanto à

capacidade larvicida em *Aedes aegypti*, no entanto, nenhuma das concentrações apresentaram efeito nas condições avaliadas.

No ensaio de alelopatia do extrato e frações, não observou-se diferença estatística significativa na porcentagem de germinação (%G) e no índice de velocidade de germinação (IVG). Já em relação ao crescimento das plântulas, verificou-se o estímulo do crescimento do hipocótilo e radícula, com exceção da fração FAC, que não demonstrou efeito significativo neste teste. No ensaio antimicrobiano, o extrato e frações não demonstraram efeito antibacteriano. Entretanto, a fração HEX, FAC e RES indicaram potencial antifúngico contra cepas de *C. albicans*.

Em relação ao potencial antioxidante, os extratos demonstraram efetiva atividade em diversos ensaios, como capacidade sequestrante do DPPH•; captura do cátion radical ABTS; redução do ferro (FRAP); redução do complexo fosfomolibdênio e sequestro do radical peroxil pelo método ORAC. Além disso, verificou-se alto teor de compostos fenólicos no extrato EBR e na fração FAC e CLO, que por meio de teste estatístico de correlação de Pearson, foi possível verificar a correlação positiva significativa com a capacidade antioxidante.

No ensaio de ativação de neutrófilos humanos, verificou-se que a Vitexina foi capaz de ativar as células, por meio da visualização da depósitos de formazan na superfície celular. Em método quantitativo, verificou-se o potencial de ativação da Vitexina foi de 83% em relação ao controle PMA. No ensaio de viabilidade celular, para a linhagem de neuroblastoma BE-M17, observou-se que as frações HEX e CLO, apresentaram comportamento dose-resposta. Já na linhagem de neuroblastoma CHLA-20, as melhores respostas foram encontradas para as frações FAC e RES. Este ensaio demonstrou que devido a composição química complexa dos extratos, cada extrato ou fração, apresentou um comportamento diferente, frente às diferentes linhagens celulares.

Em relação aos ensaios *in vivo*. Verificou-se a redução do peso do tumor de até 45% nos grupos tratados com FAC e VTX. Não observando-se alterações significativas no peso relativo dos órgãos, nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Além disso, verificou-se que os grupos tratados com EBR, FAC e VTX apresentaram redução da proliferação celular, com áreas de necrose celular em análise histológica.

No ensaio de capacidade hepatoprotetora, verificou-se que a administração de EBR e FAC reduziu a atividade das enzimas hepáticas testadas. Os níveis de creatinina e glicose, não apresentaram alterações nos tratamentos. Em relação ao estresse oxidativo, a hepatotoxicidade induzida pelo CCl₄ reduziu a atividade de enzimas antioxidantes endógenas,

como SOD e CAT. Entretanto, com a administração do EBR, FAC e VTX, a atividade dessas enzimas foi aumentada. Para a atividade de SOD, verificou-se aumento significativo para os grupos tratados com VTX. Para a atividade de GST o grupo tratado com EBR, apresentou o melhor aumento da atividade enzimática. A administração do CCl₄ reduziu os níveis de GSH total no homogenato do fígado, e os resultados encontrados neste trabalho, evidenciam significativa inibição da depleção de GSH nos grupos tratados com EBR, FAC e VTX.

Em relação à peroxidação lipídica (LPO) o grupo tratado com CCl₄ (VEH), apresentou significativo aumento LPO e os grupo tratados com o extrato e frações, demonstraram efeito contrário, reduzindo a peroxidação lipídica. Em análises histológicas, foi possível verificar a redução da área de necrose, nos grupos tratados com EBR, FAC e VTX.

Apesar dos efeitos tóxicos moderados da fração FAC e do flavonoide VTX, nos parâmetros hematológicos, estes compostos podem ser utilizados como modelo protótipo de fármacos em estudos de modificação estrutura-resposta. Além disso, o extrato bruto (EBR) que demonstrou melhor efeito hepatoprotetor, pode ser explorado pela indústria farmacêutica, para o desenvolvimento de fórmulas fitoterápicas. Entretanto, apesar dos resultados encontrados neste trabalho, outros estudos sobre eficácia, segurança e mecanismo de ação dos extratos são necessários.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos com *C. glandulosus*, demonstraram efeito alelopático e antioxidante do óleo essencial. Potencial alelopático dos extratos e frações, baixa toxicidade preliminar, capacidade antioxidante demonstrada por diferentes métodos. Potencial anti-hemolítico, fungicida, ativação de neutrófilos humanos e redução da viabilidade celular. Em estudos farmacológicos, observou-se atividade antitumoral, hepatoprotetora e redutora do estresse oxidativo causado por CCl_4 , do extrato bruto, fração acetato de etila e do flavonoide isolado Vitexina. Demonstrando potencial biológico e aplicação para as áreas agronômicas, veterinárias, cosméticas, alimentares e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-NAIME, W. A.; FAHIM, J. R.; ABDELMOHSEN, U. R.; FOUAD, M. A.; AL-FOOTY, K. O.; ABDEL-LATEFF, A. A.; KAMEL, M. S. New antimicrobial triterpene glycosides from lemon balm (*Melissa officinalis*). **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 125, p. 161-167, 2019.

ABDULLAH, F. I.; CHUA, L. S.; RAHMAT, Z. Prediction of C-glycosylated apigenin (vitexin) biosynthesis in *Ficus deltoidea* based on plant proteins identified by LC MS/MS. **Frontiers in Biology**, Beijing, v. 12, n. 6, p. 448-458, 2017.

ABED, M.; HERRMANN, T.; ALZOUBI, K.; PAKLADOK, T.; LANG, F. Tannic acid induced suicidal erythrocyte death. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Englewood Cliffs, v. 32, n. 4, p. 1106-1116, 2013.

ABEGA, D. F.; KAPCHE, D. W.; ANGO, P. Y.; MAPITSE, R.; YEBOAH, S. O.; NGADJUI, B. T. Chemical constituents of *Croton oligandrum* (Euphorbiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, Tubingen, v. 69, n. 5-6, p. 181-185, 2014.

ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, London, v. 13, n. 6, p. 494-497, 1999.

ABREU, J. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBACZEK, A. C.; FONSECA, L. M.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 4, p. 1133-1139, 2009.

ADAMI, E. R.; CORSO, C. R.; TURIN-OLIVEIRA, N. M.; GALINDO, C. M.; MILANI, L.; STIPP, M. C.; NASCIMENTO, G. E.; CHEQUIN, A.; SILVA, L. M.; ANDRADE, S. F.; DITTRICH, R. L.; QUEIROZ-TELLES, J. E.; KLASSEN, G.; RAMOS, E. A. S.; CORDEIRO, L. M. C.; ACCO, A. Antineoplastic effect of pectic polysaccharides from green sweet pepper (*Capsicum annuum*) on mammary tumor cells *in vivo* and *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 201, n. 1, p. 280-292, 2018.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2007.

ADEGAS, F. S.; VOLL, E.; PRETE, C. E. C. Embebição e germinação de sementes de picão preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 1, p. 21-25, 2003.

ADEROGBA, M. A.; MCGAW, L. J.; BEZABIH, M.; ABEGAZ, B. M. Isolation and characterisation of novel antioxidant constituents of *Croton zambesicus* leaf extract. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 25, n. 13, p. 1224-1233, 2011.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, New York, n. 105, p. 121-126, 1984.
AFRIYIE, D. K.; ASARE, G. A.; BUGYEI, K.; ASIEDU-GYEKYE, I.; GYAN, B. A.; ADJEI, S.; ADDO, P.; SITTIE, A.; NYARKO, A. K. Anti-atherogenic and anti-ischemic potentials of *Croton membranaceus* observed during sub-chronic toxicity studies. **Pharmacognosy Research**, Mumbai, v. 5, n. 1, p. 10-6, 2013.

AGUIAR, L. C. G. G.; BARROS, R. F. M. Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 419-434, 2012.

AHMED, B.; ALAM, T.; VARSHNEY, M.; KHAN, S. A. Hepatoprotective activity of two plants belonging to the Apiaceae and the Euphorbiaceae family. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 79, n. 3, p. 313–316, 2002.

AHMED, D.; NASEER, Y.; HINA, S.; BUKHARI, A. Hepatoprotective, anti-hemolytic, and anti-radical properties of cold-pressed, no-solvent, extract of bottle gourd fruit. **International Journal of Vegetable Science**, London, v. 25, n. 4, p. 330-339, 2019.

AHMED, M.; WARDLE, D. A. Allelopathic potential of vegetative and flowering ragwort (*Senecio jacobaea* L.) plants against associated pasture species. **Plant and Soil**, The Hague, v. 164, n. 1, p. 61-68, 1994.

ALDUBAYAN, M. A.; ELGHARABAWY, R. M.; AHMED, A. S.; TOUSSON, E. Antineoplastic activity and curative role of avenanthramides against the Growth of ehrlich solid tumors in mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v. 2019, p. 1-12, 2019.

ALENCAR, D. B.; MELO, A. A.; SILVA, G. C.; LIMA, R. L.; PIRES-CAVALCANTE, K. M. S.; CARNEIRO, R. F.; RABELO, A. S.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F.; VIANA, F. A.; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S. Antioxidant, hemolytic, antimicrobial, and cytotoxic activities of the tropical Atlantic marine zoanthid *Palythoa caribaeorum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p. 1113–1123, 2015.

ALI, M. Z.; MEHMOOD, M. H.; SALEEM, M.; GILANI, A. H. The use of *Euphorbia hirta* L.(Euphorbiaceae) in diarrhea and constipation involves calcium antagonism and cholinergic mechanisms. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, London, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2020.

ALONSO-CASTRO, A. J.; ORTIZ-SÁNCHEZ, E.; DOMÍNGUEZ, F.; LÓPEZ TOLEDO, G.; CHÁVEZ, M.; ORTIZ-TELLO, A. J.; GARCÍA-CARRANCA, A. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 140, n. 2, p. 438– 442, 2012.

ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* enth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral microbiology and immunology**, Washington, v. 20, n. 2, p. 101-105, 2005.

ASTM - American Society for Testing and Materials. **Annual Book of ASTM Standards: Metals Test Methods and Analytical Procedures**, 1993.

AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 30, p. 459-489, 2012.

- ANDRADE, T. C.; LIMA, S. G.; FREITAS, R. M.; ROCHA, M. S.; ISLAM, T.; SILVA, T. G.; MILITAO, G. C. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of *Croton zehntneri* (euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 1, p. 173-182, 2015.
- ANGELICO, E. C.; COSTA, J. G. M.; GALVÃO, F. F. R.; SANTOS, F. O.; RODRIGUES, O. G. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kant (sinônimo *C. rhamnifolius*): resultados preliminares. **Revista de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, v. 7, n. 1, p. 57-61, 2012.
- AQUILA, M. E. A.; UNGARETTI, J. A. C.; MICHELIN, A. Preliminary observation on allelopathic activity in *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 502, p. 383-388, 1999.
- ARAGÃO, C. F. S.; SOUZA, F. S.; BARROS, A. C. S.; VERAS, J. W. E.; BARBOSA FILHO, J. M.; MACEDO, R. O. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, p. 60-61, 2002.
- ARAÚJO, A. A. de S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 269-276, 2006.
- ARAÚJO, S.; OLIVEIRA, A.; SANTOS, M.; SANTOS, S.; FERRO, J.; BARRETO, E.; CANDIDO, A.; ARAÚJO, B.; ANTONIOLLI, A.; ESTEVAM, C. Production of reactive oxygen species in macrophages treated with essential oil of *Croton argyrophyllus* Kunth. **BioMed Central Proceedings**, London, v. 8, n. 4, p. 255.
- ARECO, V. A.; FIGUEROA, S.; COSA, M. T.; DAMBOLENA, J. S.; ZYGADLO, J. A.; ZUNINO, M. P. Effect of pinene isomers on germination and growth of maize. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 55, p. 27-33, 2014.
- ARRAIS, L. G.; LYRA, H. F. S.; BATISTA, D. C. A.; COUTINHO, F. N.; SARAIVA, A. M.; PEREIRA, R. C. A.; PISCIOTTANO, M. N. C.; XAVIER, H. S.; MELO, S. J. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 316-322, 2014.
- ASGARY, S.; NADERI, G. H.; ASKARI, N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. **Experimental & Clinical Cardiology**, Oakville, v. 10, n. 2, p. 88-90, 2005.
- ASLAM, F.; RIAZ, M.; ZUBAIR, M.; RIZWAN, K.; ABBAS, M.; BUKHARI, T. H.; BUKHARI, I. H. Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS profiling of *Carissa carandas* roots. **International Journal of Phytomedicine**, Bhopal, v. 3, n. 4, p. 567-578, 2012.
- ASRORI, M. I.; SASAMOTO, H.; OGITA, S. In Vitro Bioassay of Allelopathy in Robusta Coffee Callus Using Sandwich Method. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON FOOD,

AGRICULTURE AND NATURAL RESOURCES, 5., 2019, Ternate. **Anais...** Ternate: Atlantis Press, 2020. p. 147-151.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. *Screening* for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2011, p. 1-8, 2011.

ATTANAYAKE, A. P.; JAYATILAKA, K. A. P. W. Evaluation of antioxidant properties of 20 medicinal plant extracts traditionally used in Ayurvedic medicine in Sri Lanka. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, New Delhi, v. 15, n. 1, p. 50-56, 2016.

AYRES, M. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Antibacterial activity of useful plants and chemical constituents of the roots of *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

AYZA, M. A.; BALASUBRAMANIAN, R.; BERHE, A. H. Cardioprotective Effect of *Croton macrostachyus* Stem Bark Extract and Solvent Fractions on Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, p 1-13, 2020.

BAAH, K. A.; ACHEAMPONG, A.; AMPONSAH, I. K.; JIBIRA, Y.; OWUSU, M. O.; TIMA, L. A. Evaluation of the Anti-inflammatory, Antimicrobial and Antioxidant activities of the stem bark extract of *Croton penduliflorus* Hutch (Euphorbiaceae). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New Delhi, v. 6, n. 6, p. 1705-1710, 2017.

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-biological Interactions**, Amsterdam, v. 174, n. 2, p. 134-139, 2008.

BARBIERI, D. S.; TONIAL, F.; LOPEZ, P. V.; SALES MAIA B. H.; SANTOS, G. D.; RIBAS, M. O.; GLIENKE, C.; VICENTE, V. A. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on *in vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 887-896, 2014.

BARRETO, M. B.; GOMES, C. L.; FREITAS, J. V. B. D.; PINTO, F. D. C. L.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; TORRES, D. S. C. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 675-679, 2013.

BARTH, E. F.; PINTO, L. S.; DILELI, P.; BIAVATTI, D. C.; SILVA, Y. L.; BORTOLUCCI, W.; GAZIM, Z. C.; TAKEMURA, O. S.; ROMAGNOLO, M. B.; LAVERDE-JUNIOR, A. Biological *screening* of extracts from leaf and stem bark of *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 78, n. 4, p. 601-608, 2018.

BAS, E.; RECIO, M. C.; ABDALLAH, M.; MANEZ, S.; GINER, R. M.; Cerdan Nicolas, M.; RIOS, J. L. Inhibition of the pro-inflammatory mediators' production and anti-

inflammatory effect of the iridoid scrovalentinoside. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne v. 110, n. 3, p. 419-427, 2007

BASU, P.; MEZA, E.; BERGEL, M.; MAIER, C. Estrogenic, Antiestrogenic and Antiproliferative Activities of *Euphorbia bicolor* (Euphorbiaceae) Latex Extracts and Its Phytochemicals. **Nutrients**, Basel, v. 12, n. 1, p. 59, 2020.

BATISH, D. R.; ARORA, K.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 4, p. 566–571, 2007.

BAUMAN, E.; STOYA, G.; VÖLKNER, A.; RICHTER, W.; LEMKE, C.; LINSS, W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. **Acta Histochemica**, Jena, v. 102, n. 1, p. 21-35, 2000.

BENEDETTI, S.; BENVENUTI, F.; PAGLIARANI, S.; FRANCOGLI, S.; SCOGGIO, S.; CANESTRARI, F. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **Life sciences**, Ōsaka-shi, v. 75, n. 19, p. 2353-2362, 2004.

BENÍCIO, D. A.; QUEIROGA NETO, V.; SOUSA, J. G. Avaliação das propriedades físico-químicas e da composição química parcial do óleo de sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. juss), cultivado no município de Patos - Paraíba. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, 6., 2009, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: UFCG, 2009. p. 1-11.

BENTELEDJOUNE, M.; BOUDIAR, T.; BAKHOUCHE, A.; CONTRERAS, M. DEL M.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; BENSOUICI, C.; KABOUCHE, Z.; SEGURA-CARRETERO, A. Antioxidant activity and characterization of flavonoids and phenolic acids of *Ammoides atlantica* by RP–UHPLC–ESI–QTOF–MSⁿ. **Natural Product Research**, Milton Park, ahead of print, p. 1-5, 2019.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 15-27, 1999.

BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN, E. B. W.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF sequence data. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 92, n. 9, p. 1520-1534, 2005.

BEZUIDENHOUT, S. R. **Allelopathy as a possible cause for crop yield reductions**. Disponível em:

<https://www.kzndard.gov.za/images/Documents/RESOURCE_CENTRE/GUIDELINE_DOCUMENTS/RESEARCH_REPORTS/Allelopathy.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2019.

BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 15, p. 3643-3653, 2013.

- BHARDWAJ, M.; CHO, H. J.; PAUL, S.; JAKHAR, R.; KHAN, I.; LEE, S. J.; KIM, B. Y.; KRISHNAN, M.; KHAKET, T. P.; LEE, H. G.; KANG, S. C. Vitexin induces apoptosis by suppressing autophagy in multi-drug resistant colorectal cancer cells. **Oncotarget**, Albany, v. 9, n. 3, p. 3278-3291, 2017.
- BHAVANA, J.; KALAIVANI, M. K.; SUMATHY, A. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill. against lung cancer cell line A549. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 54, n. 6, p. 379-385, 2016.
- BISCARO, F.; PARISOTTO, E. B.; ZANETTE, V. C.; GÜNTHER, T. M. F.; FERREIRA, E. A.; GRIS, E. F.; CORREIA, J. F.; PICH, C. T.; MATTIVI, F.; FILHO, D. W.; PEDROSA, R. C. Anticancer activity of flavonol and flavan-3-ol rich extracts from *Croton celtidifolius* latex. **Pharmaceutical biology**, Lisse, v. 51, n. 6, p. 737-743, 2013.
- BLANCO, H. G. A importância dos estudos ecológicos nos programas de controle das plantas daninhas. **O Biológico**, São Paulo, v. 38, n. 10, p. 343-50, 1972.
- BORELLA, J.; WANDSCHEER, A. C. D.; BONATTI, L. C.; PASTORINI, L. H. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 3, p. 260-265, 2009.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 343-355, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, London, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, R. A. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960.
- BRASIL, D. D. S. B.; MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, J. K. R. D.; MAIA, J. G. Essential oil composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from north Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1188-1192, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Farmacopeia Brasileira**, vol. 2, 6. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009b.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, vol. 1, 6. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ACS, 2009c.
- BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de Pacatupano. **Química Nova**, São Paulo, v. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.

British Pharmacopoeia, Department of Health. British Pharmacopoeia Commission. London: The Stationary Office; 1999.

BRITO, S. S. S.; SILVA, F.; MALHEIRO, R.; BAPTISTA, P.; PEREIRA, J. A. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 113, p. 308-315, 2018.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, n. 2, p. 116-120, 2002.

CARABIA, J. P. El género *Croton* en Cuba. **Caribbean Forester**, v. 3, n. 3, p. 114-135, 1942.

CARUZO, M. B. R.; CORDEIRO, I. Sinopse da tribo *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s.) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 571-585, 2007.

CARVALHO, F. P.; MELO, C. A. D.; MACHADO, M. S.; DIAS, D. C. F. S.; ALVARENGA, E. M. The allelopathic effect of eucalyptus leaf extract on grass forage seed. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 193-201, 2015.

CASIMIRO, G. S.; MANSUR, E.; PACHECO, G.; GARCIA, R.; LEAL, I. C. R.; SIMAS, N. K. Allelopathic Activity of Extracts from Different Brazilian Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Cultivars on Lettuce (*Lactuca sativa*) and Weed Plants. **The Scientific World Journal**, Kaduna, v. 2017, p. 1-7, 2017.

CAVALCANTE, N. B.; DA CONCEIÇÃO SANTOS, A. D.; DA SILVA ALMEIDA, J. R. G. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 318, p. 108976, 2020.

CHASE, M. W.; ZMARZTY, S.; LLEDÓ, M. D.; WURDACK, K. J.; SWENSEN, S. M.; FAY, M. F. When in doubt, put in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. **Kew Bulletin**, London, v. 57, n. 1, p. 141-181, 2002.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Stuttgart, v. 17, n. 2, p. 149-151, 2010.

CHEN, H.; ZHANG, R.; LUO, R. H.; YANG, L. M.; WANG, R. R.; HAO, X. J.; ZHENG, Y. T. Anti-HIV activities and mechanism of 12-O-tricosanoylphorbol-20-acetate, a novel phorbol ester from *Ostodes katharinae*. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 9, p. 1498, 2017.

CHIRINOS, R.; CAMPOS, D.; WARNIER, M.; PEDRESCHI, R.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, New York, v. 111, n. 1, p. 98-105, 2008.

CHON, S. U.; JANG, H. G.; KIM, D. K.; KIM, Y. M.; BOO, H. O.; KIM, Y. J. Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 309-317, 2005.

CHOO, C. Y.; SULONG, N. Y.; MAN, F.; WONG, T. W. Vitexin and isovitexin from the leaves of *Ficus deltoidea* with in-vivo α -glucosidase inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 142, n. 3, p. 776-781, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M07-A8: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA, USA, 2008a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M38-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard Document. Wayne, PA, USA, 2008b.

COELHO, P. L. C.; AMPARO, J. A. O.; SILVA, A. B. DA; SILVA, K. C. DA; BRAGA-DE-SOUZA, S.; BARBOSA, P. R.; LOPES, G. P. F.; COSTA, S. L. Apigenin from *Croton betulaster* Müll restores the immune profile of microglia against glioma cells. **Phytotherapy Research**, London, ahead of print, p. 1-12, 2019.

COLEY, P. G.; BRYANT, J. P.; CHAPIN, F. S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, New York, v. 230, n. 4728, p. 895-899, 1985.

COLIC, M.; PAVELIC, K. Molecular mechanism of anticancer activity of natural dietetic products. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 78, n. 6, p. 333-336, 2000.

CORDEIRO, K. W.; FELIPE, J. L.; MALANGE, K. F.; DO PRADO, P. R.; DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, P.; GARCEZ, F. R.; DE CASSIA FREITAS, K.; GARCEZ, W. S.; TOFFOLI-KADRI, M. C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 183, n. 13, p. 128-135, 2016.

CORLAY, N.; DELANG, L.; GIRARD-VALENCIENNES, E.; NEYTS, J.; CLERC, P.; SMADJA, J.; GUERITTE, F.; LEYSSEN, P.; LITAUDON, M. Tiglane diterpenes from *Croton mauritanus* as inhibitors of chikungunya virus replication. **Fitoterapia**, Milano, v. 97, p. 87-91, 2014.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUNHA, S. L.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; FRIES, D. D. Avaliação da atividade larvívica de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 27, n. 2, p. 79-85, 2014.

CYBORAN-MIKOŁAJCZYK, S.; CSONKA, Á.; MOLNAR, J.; SZABÓ, D.; OSZMIANŃSKI, J.; KLESZCZYŃSKA, H. *In vitro* studies of anti-hemolytic and cytotoxic activity of procyanidin-rich extract from the leaves of *Actinidia arguta*. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, Olsztyn, v. 68, n. 2, p. 171-177, 2018.

DANIEL, P. S. In: DANIEL, P. S.; ABBA, I. T.; TRISTRAM, G. P. (Eds): Basic and Clin Immunology, 8th edition, USA. Appleton and Lange, 1994. p. 195-2.

DAOUDA, T.; PREVOST, K.; GUSTAVE, B.; JOSEPH, D. A.; NATHALIE, G.; RAPHAËL, O.; RUBENS D.; CLAUDE C. J.; MIREILLE D.; FELIX, T. Terpenes, antibacterial and modulatory antibiotic activity of essential oils from *Croton hirtus* L'Hér.(Euphorbiaceae) from Ivory Coast. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, London, v. 17, n. 4, p. 607-616, 2014.

DE ARAÚJO, A. C.; FREITAS, P. R.; RODRIGUES DOS SANTOS BARBOSA, C.; MUNIZ, D. F.; ESMERALDO ROCHA, J.; ARAÚJO NETO, J. B.; SILVA, M. M. C. DA; MOURA, T. F.; PEREIRA, R. L. S.; RIBEIRO-FILHO, J.; SILVA, L. E.; AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; TINTINO, S. R.; IRITI, M.; VITALINI, S.; COUTINHO, H. C. M. Essential Oil of *Croton ceanothifolius* Baill. Potentiates the Effect of Antibiotics against Multiresistant Bacteria. **Antibiotics**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 27, 2020.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 5, p. 573-578, 2002.

DIAS, J. F. G.; CÍRIO, G. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Contribution to the allelopathic study of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 220-223, 2005.

DÍAZ, J. G.; TUENTER, E.; ARRANZ, J. C. E.; MAURY, G. L.; COS, P.; PIETERS, L. Antimicrobial activity of leaf extracts and isolated constituents of *Croton linearis*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 236, p. 250-257, 2019.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A review, part 1. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 55, n. 2, p. 159-222, 2007.

DOEING, D. C.; BOROWICZ, J. L.; CROCKETT, E. T. *Gender dimorphism* in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. **BioMed Central Clinical Pathology**, London, v. 3, n. 1, p. 3, 2003.

DONG, L.; FAN, Y.; SHAO, X.; CHEN, Z. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 12, p. 3211-3216, 2011.

DOS SANTOS, P. M.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. (2005). Flavonoides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 321-325, 2005.

DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON, J. M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1768-1774, 2009.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; RIMANDO, A. M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 99-112, 2000.

DUTRA, J. A. P.; VILLANOVA, J. C. O.; SEVERI, J. A. Obtenção do extrato das folhas de *Croton urucurana* Baill.(Euphorbiaceae) e desenvolvimento de emulsão. **Revista Univap**, São José dos Campos, v. 22, n. 40, p. 187, 2016.

DUTTA, S.; CHAKRABORTY, A. K.; DEY, P.; KAR, P.; GUHA, P.; SEN, S.; KUMAR, A.; SEN, A.; CHAUDHURI, T. K. Amelioration of CCl₄ induced liver injury in swiss albino mice by antioxidant rich leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill. **PloS One**, San Francisco, v. 13, n. 4, p. e0196411, 2018.

EREN-GUZELGUN, B.; INCE, E.; GURER-ORHAN, H. *In vitro* antioxidant/prooxidant effects of combined use of flavonoids. **Natural product research**, Milton Park, v. 32, n. 12, p. 1446-1450, 2018.

ERESANYA, O. I.; AVOSEH, O. N.; OGUNWANDE, I. A.; LAWAL, O. A.; GIWA-AJENIYA, A. F. Chemical Constituents of Essential Oil from the Leaves of *Phyllanthus muellerianus* (O. Kuntze) Exell. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, London, v. 22, n. 3, p. 865-870, 2019.

FAHN, A. **Plant anatomy**. Oxford: Pergamon Press, 1990.

FARNSWORTH, N. R.; BLOMSTER, R. N.; MESMMER, W. M.; KING, J. C.; PERSINOS, G. J.; WILKES, J. D. A phytochemical and biological review of the genus *Croton*. **Lloydia**, Cincinnati, n. 32, v. 1, p.1-28, 1969.

FEDELI, D.; BERRETTINI, M.; GABRYELAK, T.; FALCIONI, G. The effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 563, n. 2, p. 89-96, 2004.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FIORENTINO, A.; D'ABROSCA, B.; PACIFICO, S.; IZZO, A.; LETIZIA, M.; ESPOSITO, A.; MONACO, P. Potential allelopathic effects of stilbenoids and flavonoids from leaves of *Carex distachya* Desf. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 36, n. 9, p. 691-698, 2008.

FLOEGEL, A.; KIM, D.-O.; CHUNG, S.-J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011.

FLORA BRASIL. ***Croton* in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17514>>. Acesso em: 13 nov. 2018

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of essential oils of *Croton species* from the Brazilian

Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 5, p. 1383-1390, 2008.

FONTEQUE, J. H.; SAITO, M. E.; RIZELO, P. A.; TEIXEIRA, W. T.; KOHAYAGAWA, A. Comparação entre duas metodologias para a realização do teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 1-4, 2015.

FONTES, J. R. A.; SHIRATSUCHI, L. S.; NEVES, J. L.; JULIO, L.; FILHO, J. S. **Manejo Integrado de Plantas Daninhas**. Planaltina: Embrapa, 2003.

FORMAGIO, A. S. N.; MASETTO, T. E.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; DA COSTA, W. F.; TREVIZAN, L. N. F.; SARRAGIOTTO, M. H. Potencial alelopático de *Tropaeolum majus* L. na germinação e crescimento inicial de plântulas de picão-preto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 1, p. 83-89, 2011.

FUJIWARA, G. M.; ANNIES, V.; DE OLIVEIRA, C. F.; LARA, R. A.; GABRIEL, M. M.; BETIM, F. C.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V.; DIAS, J. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MARQUES, F. A.; ZANIN, S. M. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 139, p. 238-244, 2017.

FULZELE, S. V.; SATTURWAR, P. M.; JOSHI, S. B.; DORLE, A. K. Study of immunomodulatory activity of *Haridradi gharita* in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, Pondicherry, v. 35, p. 51-54, 2003.

FURLAN, C. M.; SANTOS, K. P.; SEDANO-PARTIDA, M. D.; DA MOTTA, L. B.; SANTOS, D. Y. A.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Flavonoids and antioxidante potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 693-702, 2015

GANACHARI, M. S.; KUMAR, S.; BHAT, K. G. Effect of *Ziziphus jujuba* leaves extract on phagocytosis by human neutrophils. **Journal of Natural Remedies**, Bangalore, v. 4, n. 1, p. 47-51, 2004.

GANESAN, K.; XU, B. Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: a critical review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1401, n. 1, p. 102-113, 2017.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, Basel, v. 45, n. 1, p. 41-45, 1998.

GARRISON, R. K.; GALLOWAY, R. H.; HEUSER, L. S. Mechanism of malignant ascites production. **The Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 42, n. 2, p. 126-32, 1987.

GATTI, A. B.; FERREIRA, A. G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S. C. G. de A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artistolochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 454-461, 2010.

GERTSCH, J. Antiinflammatory cannabinoids in diet—towards a better understanding of CB2 receptor action? Towards a better understanding of CB2 receptor action?. **Communicative & Integrative Biology**, Austin, v. 1, n. 1, p. 26-28, 2008.

GEY, K.F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. **Biofactors**, Oxford, v. 7, n. 1–2, p. 113-174, 1998

GIANG, P. M.; LEE, J. J.; SON, P. T. Flavonoid glucosides from the leaves of *Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae. **Tạp Chí Hóa Học**, Hà-nội, v. 42, n. 1, p. 125-128, 2004.

GIL, E.; CUCA, L. E.; DELGADO, W. A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Ocotea caudata* (Nees) Mez (Lauraceae) from Colombia. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Aromáticas**, Santiago, v. 15, n. 4, p. 258-263, 2016.

GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, R.; DIAZ, B. K.; AGUILAR, M. I.; DIEGO, N.; LOTINA HENNSEN, B. Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. as Water-Splitting Enzyme Inhibitor on Thylakoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 4, p. 1217–1221, 2006.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. *Croton*. In: GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A.; CARTER, S. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. Kem: Royal Botanic Gardens, 2000. p.417-536.

GRIFFIN, D.T.; DODD, N.J.; ZHAO, S.; PULLAN, B.R.; MOORE, J.V. Low-level direct electrical current therapy for hepatic metastases. I. Preclinical studies on normal liver. **British Journal of Cancer**, London, v. 72, n. 1, p. 31-34, 1995.

GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, J. E.; PAMPLONA, S. S.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 65, n. 8, p. 687-689, 1999.

GRZESIK, M.; NAPARŁO, K.; BARTOSZ, G.; SADOWSKA-BARTOSZ, I. Catechins and other flavonoids as protectors against undesired modifications of biomolecules. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 124, p. 568, 2018.

GRZYBOWSKI, A.; TIBONI, M.; DA SILVA, M. A.; CHITOLINA, R. F.; PASSOS, M.; FONTANA, J. D. The combined action of phytolarycides for the control of dengue fever vector, *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 549-557, 2012.

GUEMMAZ, T.; ZERARGUI, F.; BOUMERFEG, S.; ARRAR, L.; AOUACHRIA, S.; KHENNOUF, S.; CHAREF, N. E.; BAGHIANI, A. Anti-hemolytic, Anti-lipid Peroxidation, Antioxidant Properties and Acute Toxicity of *Xanthium strumarium* Leaves Extracts. **Annual Research & Review in Biology**, Hooghly, v. 24, n. 3, p. 1-12, 2018.

GUERRERO, M. F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTIN, M. L.; ROMÁN, L. S. Quercetin 3,4-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeianus* Schleacht. **Journal of Pharmaceutics and Pharmacology**, Los Angeles, v. 54, n. 10, p. 1373-1378, 2002.

GUPTA, D.; GUPTA, R. K. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: *in vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 11, n. 13, p. 1-9, 2011.

GUPTA, M.; MAZUMBER, U. K.; KUMAR, R.S.; KUMAR, T.S. Antitumor activity and antioxidant role of Bauhinia racemosa against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 25, n. 8, p. 1070-1076, 2004.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. R. Glutathione-S-transferase the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 1999.

HALVORSEN, B. L.; HOLTE, K.; MYHRSTAD, M. C.; BARIKMO, I.; HVATTUM, E.; REMBERG, S. F.; WOLD, A. B.; HAFFNER, K.; BAUGERØD, H.; ANDERSEN, L. F.; MOSKAUG, Ø.; JACOBS, D. R. JR.; BLOMHOFF, R. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 132, n. 3, p. 461-471, 2002.

HAMEED, A.; HUSSAIN, S. A.; YANG, J.; IJAZ, M. U.; LIU, Q.; SULERIA, H. A. R.; SONG, Y. Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). **Nutrients**, Basel, v. 9, n. 10, p. 1101, 2017.

HASHEM, M. A.; MOHAMED, H. M.; MAGDA, S. H. Clinicopathological, pathological and biophysical studies on the effect of electromagnetic field on the Ehrlich tumour cells implanted in mice. **Egyptian journal of comparative pathology and clinical pathology**, Beni Suef, v. 17, n. 2, p. 117-147, 2004

HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; HAMDI, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**, New York, v. 105, n. 3, p. 1126-1134, 2007.

HE, Y.; XIA, Z.; YU, D.; WANG, J.; JIN, L.; HUANG, D.; YE, X.; LI, X.; ZHANG, B. Hepatoprotective effects and structure-activity relationship of five flavonoids against lipopolysaccharide/d-galactosamine induced acute liver failure in mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 68, p. 171-178, 2019.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HOEHNE, F.C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicianais**. São Paulo: Graficars, 1939.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n.16, p. 4437-4444, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, W.; WANG, J.; LIANG, Y.; GE, W.; WANG, G.; LI, Y.; CHUNG, H. Y. Potent anti-angiogenic component in *Croton crassifolius* and its mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 175, p. 185-191, 2015.

HUO, H. Z.; WANG, B.; LIANG, Y. K.; BAO, Y. Y.; GU, Y. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 10, p. 6529-6543, 2011.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, Alexandria, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

INAYAT, N.; ZAHIR MUHAMMAD, R.; MAJEED, A. 90. Phytochemical screening and allelopathic evaluation of aqueous and methanolic leaf extracts of *Populus nigra* L. **Pure and Applied Biology (PAB)**, Quetta, v. 9, n. 1, p. 956-962, 2020.

INOUE M. H.; SANTANA, D. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; PEREIRA, M. J. B.; PEREIRA, K. M. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: efeitos sobre plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 489-498, 2010.

ISLAM, M. S.; ARA, H.; AHMAD, K. I.; UDDIN, M. M. A review on medicinal uses of different plants of Euphorbiaceae family. **Universal Journal of Pharmaceutical Research**, Kashipur, v. 4, p. 47-51, 2019.

ISUÁREZ, A. L. Í. R. I. C. A.; MATEU, E.; CHÁVEZ, K.; SCOMPAGNONE, R. E. I. N. A. L. D. O.; ORSINI, G.; TILLET, S.; ISRAEL, A. Perfil fitoquímico y farmacológico de *Croton micans* Sw. Una visión general. **Revista Facultad de Farmacia**, Mérida, v. 75, n. 2, p. 2-13, 2012.

ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; MOCHIZUKI, M.; ENOMORI, T.; MORITA, H.; SHIROTA, H.; INAMATSU, M.; TAKEYA, K. A. Cytotoxic substance from sangre-de drago. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 39, n. 4, p. 1041-1042, 1991.

JACOBI, U. S.; FERREIRA, A. G. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 7, p. 935-943, 1991.

JIANG, Z.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, University Park, PA, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

JONES, K. Review of Sangre de Drago (*Croton lechleri*) – A South american tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, New York, v. 9, n. 6, p. 877-896, 2003.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

JÚNIOR, F. E.; MACEDO, G. E.; ZEMOLIN, A. P.; SILVA, G. F. D.; CRUZ, L. C. D.; BOLIGON, A. A.; DE MENEZES, I. R.; FRANCO, J. L.; POSSER, T. Oxidant effects and toxicity of *Croton campestris* in *Drosophila melanogaster*. **Pharmaceutical biology**, Lisse, v. 54, n. 12, p. 3068-3077, 2016.

KADHUM, A. A. H.; AL-AMIERY, A. A.; MUSA, A. Y.; MOHAMAD, A. B. The antioxidant activity of new coumarin derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 9, p. 5747-5761, 2011.

KAEMCHANTUEK, P.; CHOKCHAISIRI, R.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; CHUNGLOK, W.; UTAIPAN, T.; CHAMULITRAT, W.; SUKSAMRARN, A. Terpenoids with potent antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* from *Trigonostemon reidioides* roots. **Tetrahedron**, Oxford, v. 73, n. 12, p. 1594-1601, 2017.

KAMIHARA, J.; BOURDEAUT, F.; FOULKES, W. D.; MOLENAAR, J. J.; MOSSÉ, Y. P.; NAKAGAWARA, A.; PARAREDA, A.; SCOLLON, S. R.; SCHNEIDER, K. W.; SKALET, A. H.; STATES, L. J.; WALSH, M. F.; DILLER, L. R.; BRODEUR, G. M. Retinoblastoma and neuroblastoma predisposition and surveillance. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 23, n. 13, p. e98-e106, 2017.

KAPOOR, R.; GUNDPATIL, D. B.; SOMANI, B. L.; SAHA, T. K.; BANDYOPADHYAY, S.; MISRA, P. Anticancer effect of dl-glyceraldehyde and 2-deoxyglucose in ehrlich ascites carcinoma bearing mice and their effect on liver, kidney and haematological parameters. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v. 29, n. 2, p. 213-20, 2014.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, New York, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009.

KARAMAĆ, M. Antioxidant activity of tannin fractions isolated from buckwheat seeds and groats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champign, v. 87, n. 5, p. 559-566, 2010.

KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate);

ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 140, n. 1, p. 47–52, 2005.

KERSCHER, F.; FRANZ, G. Biosynthesis of vitexin and isovitexin: enzymatic synthesis of the C-glucosylflavones vitexin and isovitexin with an enzyme preparation from *Fagopyrum esculentum* M. seedlings. **Zeitschrift für Naturforschung. C**, Tübingen, v. 42, n. 5, p. 519-524, 1987.

KHAN, S. S.; CHAGHTAI, S. A. Euphorbiaceae of Bhopal and their medicinal utility. **Journal of Scientific Research**, Bhopal, v. 2, n. 2, p. 75-76, 1979.

KHOLE, S.; PANAT, N. A.; SURYAWANSHI, P.; CHATTERJEE, S.; DEVASAGAYAM, T. P. A.; GHASKADBI, S. Comprehensive assessment of antioxidant activities of apigenin isomers: Vitexin and Isovitexin. **Free Radicals & Antioxidants**, Bangalore, v. 6, n. 2, p. 155-166, 2016.

KILANI, M. A.; HASSAN, A. Z.; FADASON, S. T.; OBALOWU, A. M.; ALIYU, A.; KILANI, H. B. In-vitro and in-vivo antibacterial effect of *Croton lobatus* Linnaeus L. on two days post surgical wounds in rats. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, Dacca, v. 54, n. 2, p. 139-146, 2019.

KIM, J. H.; LEE, S. J.; HAN, Y. B.; MOON, J. J.; KIM, J. B. Isolation of isoguanosine from *Croton tiglium* and its antitumor activity. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 17, n. 2, p. 115-118, 1994.

KITAGAWA, S.; SAKAMOTO, H.; TANO, H. Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 52, n. 8, p. 999-1001, 2004.

KRONESTEDT-ROBARDS, E.; ROBARDS, A. W. Exocytosis in gland cells. In: HAWES, C. R.; COLEMAN, J. O. D.; EVANS, D. E. (Ed). **Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 199-232.

KRUGER, P.; SAFFARZADEH, M.; WEBER, A. N.; RIEBER, N.; RADSAK, M.; VON BERNUTH, H.; BENARAF, C.; ROOS, D.; SKOKOWA, J.; HARTL, D. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. e1004651, 2015.

KUMAR, A.; SINGH, V.; GHOSH, S. An experimental evaluation of *in vitro* immunomodulatory activity of isolated compound of *Ricinus communis* on human neutrophils. **International Journal of Green Pharmacy**, Mumbai, v. 5, n. 3, p. 201-204, 2011.

KUMAR, R.; CHATURVEDI, A. K.; SHUKLA, P. K.; LAKSHMI, V. Antifungal activity in triterpene glycosides from the sea cucumber *Actinopyga lecanora*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 17, n. 15, p. 4387-4391, 2007.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Phenolic content, reducing power and membrane protective activities of *Solanum xanthocarpum* root extracts. **Vegetos: an International Journal of Plant Research**, Bareilly, v. 26, n. 1, p. 301-307, 2013.

KUMARI, M.; JAIN, S. Tannins: An antinutrient with positive effect to manage diabetes. **Research Journal of Recent Sciences**, Indore, v. 1, n. 12, p. 1-8, 2012.

LAGNIKA, L.; WENIGER, B.; SENECHÉAU, C.; SANNI, A. Antiprotozoal activities of compounds isolated from *Croton lobatus* L. **African Journal of Infectious Diseases**, Nigéria, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2009.

LAN, Y. H.; YEN, C. H.; LEU, Y. L. Chemical constituents from the aerial parts of *Euphorbia formosana* Hayata and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 88, p. 103967, 2020.

LEAL, L. K. A. M.; FERREIRA, A. A. G.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 70, n. 2, p. 151-159, 2000.

LEE, S.; SIVAKUMAR, K.; SHIN, W. S.; XIE, F.; WANG, Q. Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 16, n. 17, p. 4596-4599, 2006.

LENCINA, C.; PIRES, V. S.; GOSMANN, G.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Tilirosideo em *Croton gnaphalii* Bail. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 11, p. 89-94, 2001.

LEONHARDT, V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S.; ALBUQUERQUE, A. A.; PORTO, R. S.; CELEDÔNIO, N. R.; OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA, R. F.; SILVA, L. P.; GARCIA-TEÓFILO, T. M. N.; SILVA, A. P.; MAGALHÃES, P. J.; DUARTE, G. P.; SILVA, A. P. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Paris, v. 24, n. 6, p. 749-758, 2010.

LEVINSKY, R. J.; HARVEY, B. A.; RODECK, C. H.; SOOTHILL, J. F. Phorbol myristate acetate stimulated NBT test: a simple method suitable for antenatal diagnosis of chronic granulomatous disease. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 595-598, 1983.

LILA, M. A.; RASKIN, I. Health-related interactions of phytochemicals. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 70, n. 1, p. 20-27, 2005.

LIMA, G. S.; CASTRO-PINTO, D. B.; MACHADO, G. C.; MACIEL, M. A.; ECHEVARRIA, A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Stuttgart, v. 22, n. 12, p. 1133-1137, 2015.

LIMA, M. G.; MAIA, I. C.; SOUSA, B. D.; MORAIS, S. M.; FREITAS, S. M. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 211-214, 2006.

LIMA-ACCIOLY, P. M.; LAVOR-PORTO, P. R.; CAVALCANTE, F. S.; MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; MORAIS, S. M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Essential oil of *Croton nepetaefolius* and its main constituent, 1,8-cineole, block excitability of rat sciatic nerve *in vitro*. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 1158-1163, 2006.

LINS NETO, J. D. R.; UCHOA, A. D. A.; DE MOURA, P. A.; BEZERRA FILHO, C. M.; TENÓRIO, J. C. G.; DA SILVA, A. G.; XIMENES, R. M.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Phytochemical *screening*, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 10, n. 27, p. 409-416, 2016.

LIU, N.; WANG, K. S.; QI, M.; ZHOU, Y. J.; ZENG, G. Y.; TAO, J.; ZHOU, J. D.; ZHANG, J. L.; CHEN, X.; PENG, C. Vitexin compound 1, a novel extraction from a Chinese herb, suppresses melanoma cell growth through DNA damage by increasing ROS levels. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, Roma, v. 37, n. 1, p. 269, 2018.

LIU, X.; JIANG, Q.; LIU, H.; LUO, S. Vitexin induces apoptosis through mitochondrial pathway and PI3K/Akt/mTOR signaling in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Biological Research**, Santiago, v. 52, n. 1, p. 7, 2019.

LIU, Y.; HUANG, Y.; XU, Y.; QU, P.; WANG, M. Memantine protects against ischemia/reperfusion-induced brain endothelial permeability. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, London, v. 70, n. 4, p. 336-343, 2018.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, Mumbai, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

LOPES, E. L.; ANDRADE NETO, M.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R. Flavonoids and sesquiterpenes of *Croton pedicellatus* Kunth. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 2169-2172, 2012.

LOPES, M. I.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S.; HENRIQUES, J. A. P.; SALVADOR, M. Mutagenic and antioxidante activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 95, n. 2-3, p. 437-445, 2004.

LUCENA, M. D. F. A.; AMORIM, B. S.; ALVES, M. Sinopse das espécies de Euphorbiaceae s. l. do Parque Nacional Serra de Itabaiana, Sergipe, Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró v. 22, n. 4, p. 214-224, 2009.

LUCENA, M. D. F. D. A.; SALES, M. F. D. Triconomas foliares em espécies de *Croton* L. (Crotonoideae-Euphorbiaceae). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 1, p. 11-25, 2006.

LUKA, M. I.; ONUOHA, S. C.; OLADELE, V. O.; AGUIYI, J. Phytochemical screening and in vitro evaluation of antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of root and stem bark of *Bridelia ferruginea*. Benth.(Euphorbiaceae), **Journal of Medicinal Plant Research**, Lagos, v. 14, n. 1, p. 54-61, 2020.

LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; SOOBRATTEE, M. A.; ARUOMA, O. I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 18, p. 5042–7, 2002.

MABRY, T.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer Science & Business Media, 2012.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; CÔLUS, I. M.; FARIAS, R. A.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V. S. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 70, n. 1, p. 41–55, 2000.

MADAGUNDI, S. D.; PAWADSHETTER, M. K.; SHOLAPUR, H. P.; HABBU, P.; BIRADAR, S. M. A comparative study of isolated flavonoid and different extracts of *Caesalpinia pulcherrima* (L) Sw. for *in vitro* immunomodulatory effects on human neutrophils. **Asian Journal of Traditional Medicines**, Hong Kong, v. 7, n. 4, p. 159-167, 2012.

MAGALHÃES, A. S.; SILVA, B. M.; PEREIRA, J. A.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; CARVALHO, M. Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 1372-1377, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAHMOUD, E. A. Anticarcinogenic effect of grape seeds extract against ehrlich ascites tumour in mice. **Global Veterinaria**, Dubai, v. 15, n. 2, p. 207-214, 2015.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: Interações Químicas Entre Espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente**. Chapecó: Agros, 2001. p. 505-521.

MALLIK, M. A. B.; WILLIAMS, R. D. Allelopathic principles for sustainable agriculture. **Allelopathy Journal**, Hisar, v. 24, n. 1, p. 1-34, 2009.

MANCINI, E.; DE MARTINO, L.; MARANDINO, A.; SCOGNAMIGLIO, M. R.; DE FEO, V. Chemical composition and possible *in vitro* phytotoxic activity of *Helichrysium italicum* (Roth) Don ssp. italicum. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 9, p. 7725–7735, 2011.

MARÍN, L.; GUTIÉRREZ-DEL-RÍO, I.; YAGÜE, P.; MANTECA, Á.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. De novo biosynthesis of apigenin, luteolin, and eriodictyol in the actinomycete

Streptomyces albus and production improvement by feeding and spore conditioning. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 921, 2017

MARIS, J. M.; HOGARTY, M. D.; BAGATELL, R. Neuroblastoma. **The Lancet**, New York, v. 369, n. 9579, p. 2106-2120, 2007.

MARKERT, M.; ANDREWS, P. C.; BABIOR, B. M. Measurement of O₂ production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. **Methods in Enzymology**, New York, v. 105, p. 358-365, 1984.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Phytochemical prospection and modulation of aminoglycoside antibiotic activity by *Croton campestris* A. **Chemotherapy**, Los Angeles, v. 57, n. 4, p. 305-309, 2011.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC Edições, 1997. MCLAUGHLIN, J. L. Paw Paw and Cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 71, n. 7, p. 1311-1321, 2008.

MEIRELES, D. R. P.; FERNANDES, H.; ROLIM, T. L.; BATISTA, T. M.; MANGUEIRA, V. M.; DE SOUSA, T. K. G.; PITAM, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; BELTRÃO, D. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; MEDEIROS, K. K. P.; SOBRAL, M. V. Toxicity and antitumor efficacy of *Croton polyandrus* oil against Ehrlich ascites carcinoma cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 751-758, 2016.

MENEZES TORRES, M. da C. **Estudo Químico e Biológico de *Croton regelianus* var. *matosii* (Euphobiaceae)**. 2008. 210 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará Fortaleza, 2008.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. *Screening* of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, London, v.15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. *Brine shrimp*: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MEZITI, H.; BOURICHE, H.; KADA, S.; DEMIRTAS, I.; KIZIL, M.; SENATOR, A. Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, Antofagasta, v. 7, n. 4, p. 260-272, 2019.

MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise em fitoquímica. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MIRANDA-VILELA, A. L.; PORTILHO, F. A.; DE ARAUJO, V. G.; ESTEVANATO, L. L.; MEZZOMO, B. P.; MARIA DE FÁTIMA, M.; LACAVA, Z. G. The protective effects of nutritional antioxidant therapy on *Ehrlich solid* tumor-bearing mice depend on the type of

antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 22, n. 11, p. 1091-1098, 2011.

MOHAMED, I. E.; EL NUR, E. E.; CHOUDHARY, M. I.; KHAN, S. N. Bioactive natural products from two Sudanese medicinal plants *Diospyros mespiliformis* and *Croton zambesicus*. **Records of Natural Products**, Turkey, v. 3, n. 4, p. 198-203, 2009.

MOHAMMED, T.; ERKO, B.; GIDAY, M. Evaluation of antimalarial activity of leaves of *Acokanthera schimperi* and *Croton macrostachyus* against *Plasmodium berghei* in Swiss albino mice. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 14, n. 1, p. 314, 2014.

MOHD ALI, N. I.; ANNEGOWDA, H. V.; MANSOR, S. M.; ISMAIL, S.; RAMANATHAN, S.; MORDI, M. N. Phytochemical *screening*, antioxidant and analgesic activities of *Croton argyratus* ethanolic extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 6, n. 21, p. 3724-3731, 2012.

MONGALO, N. I.; SOYINGBE, O. S.; MAKHAFOLA, T. J. Antimicrobial, cytotoxicity, anticancer and antioxidant activities of *Jatropha zeyheri* Sond. roots (Euphorbiaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Singapore, v. 9, n. 7, p. 307, 2019.

MONTANARI JÚNIOR, I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 2002.

MONTEIRO, P. A.; ZELIOLI, Í. A. M.; SOUSA, I. M. de O.; RUIZ, A. L. T. G.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. de. Chemical composition and antiproliferative activity of *Croton campestris* A. St.-Hil. essential oil. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 33, n. 4, p. 1-4, 2019.

MORAIS, S. M.; CATUNDA, F. E. A.; DA SILVA, A. R. A.; NETO, J. M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 907, 2006.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOREIRA, J.; KLEIN-JÚNIOR, L. C.; CECHINEL FILHO, V.; DE CAMPOS BUZZI, F. Anti hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 146, n. 1, p. 318-323, 2013.

MOTTA, L. B.; FURLAN, C. M.; SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; DUARTE ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; CORDEIRO, I.; SALATINO, A. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 972-977, 2011.

MULUYE, A. B.; DESTA, A. G.; ABATE, S. K.; DANO, G. T. Anti-malarial activity of the root extract of *Euphorbia abyssinica* (Euphorbiaceae) against *Plasmodium berghei* infection in mice. **Malaria Journal**, London, v. 18, n. 1, p. 261, 2019.

MURRELL, C.; GERBER, E.; KREBS, C.; PAREPA, M.; SCHAFFNER, U.; BOSSDORF, O. Invasive knotweed affect native plants through allelopathy. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 98, n. 1, p. 38-43, 2011.

MUSHTAQ, W.; SIDDIQUI, M. B.; HAKEEM, K. R. Allelopathy Potential of Weeds Belonging to the Family. In: **Allelopathy**. Cham: Springer, 2020. p. 37-43.

NANDI, M. V. P.; HAFSAH, S. Phytochemical test fraction N-hexane allelopathy goat weed extracts (*Ageratum conyzoides* L.) on the growth of thorn spinach (*Amarantus spinosus* L.). In: IOP CONFERENCE SERIES: EARTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCE, 2019, Banda Aceh. **Anais...** Banda Aceh: IOP Publishing, 2020. p. 012039.

NARDI, G. M.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M.; DELE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Stuttgart, v. 14, n. 2-3, p. 115-122, 2007.

NASCIMENTO, A. M.; MARIA-FERREIRA, D.; DAL LIN, F. T.; KIMURA, A.; DE SANTANA-FILHO, A. P.; WERNER, M. F. D. P.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R.; DE SOUZA, L. M. Phytochemical analysis and anti inflammatory evaluation of compounds from an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 145, p. 821-830, 2017.

NASCIMENTO, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M.; SOUSA, A. N.; OLIVEIRA, F. Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

NASMA, A.; AISHATH, N.; AZILAH, A.; SULAIMAN, A. Z. Optimization of vitexina and isovitexin compounds extracted from dried Mas Cotek leaves using one-factor-at-a time (OFAT) approach in aqueous extraction. **International Food Research Journal**, Malaysia, v. 25, n. 6, p. 2560-2571, 2018.

NATH, R.; ROY, S.; DE, B.; CHOUDHURY, M. D. Anticancer and antioxidant activity of *Croton*: a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya, v. 5, n. 2, p. 63-70, 2013.

NATHAN, D. G. NBT reduction by human phagocytes. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 290, n. 5, p. 280-281, 1974.

NDHLALA, A.; ADEROGBA, M.; NCUBE, B.; VAN STADEN, J. Anti-oxidative and cholinesterase inhibitory effects of leaf extracts and their isolated compounds from two closely related *Croton* species. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 2, p. 1916-1932, 2013.

NGUTA, M.; GAKUYA, G.; KABASA e KIAMAE. Biological screening of kenyan medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, Salerno, v. 2, p. 458-478, 2011.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Ed). **Ciências Farmacêuticas: contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Editora UNIVALI, 2003. p. 10-56.

NILSSON, J.; PILLAI, D.; ÖNNING, G.; PERSSON, C.; NILSSON, A.; AKESSON, B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazol-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 49, n. 3, p. 239–246, 2005.

NISHIDA, N.; TAMOTSU, S.; NAGATA, N.; SAITO, C.; SAKAI, A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 5, p. 1187–1203, 2005.

NJOYA, E. M.; ELOFF, J. N.; MCGAW, L. J. *Croton gratissimus* leaf extracts inhibit cancer cell growth by inducing caspase 3/7 activation with additional anti-inflammatory and antioxidant activities. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 18, n. 1, p. 305, 2018.

NOREEN, H.; SEMMAR, N.; FARMAN, M.; MCCULLAGH, J. S. O. Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Heidelberg, v. 10, n. 8, p. 792–801, 2017.

OBEY, J. K.; VON WRIGHT, A.; ORJALA, J.; KAUKANEN, J.; TIKKANEN-KAUKANEN, C. Antimicrobial activity of *Croton macrostachyus* stem bark extracts against several human pathogenic bacteria. **Journal of Pathogens**, Cairo, v. 2016, p. 1-5, 2016.

OGRZEWALSKA, M. *Croton lundianus* (Euphorbiaceae). Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/22824835@N07/26534499249/>>. Acesso em: 13 nov. 2018.

OKUNO, Y.; MARUMOTO, S.; MIYAZAWA, M. Antimutagenic activity of flavonoids from Sozoku. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 33, n. 6, p. 862-865, 2019.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. G.; FERRAZ, C. A. A.; PONTES, M. C.; CAVALCANTE, N. B.; ARAÚJO, E. C. da C.; OLIVEIRA, A. P.; PICOT, L.; ROLIM, L. A.; ALMEIDA, J. R. G. da S. Antibacterial activity of terpenoids isolated from *Cnidoscolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae), a Brazilian medicinal plant from Caatinga biome. **European Journal of Integrative Medicine**, Amsterdam, v. 24, p. 30-34, 2018.

OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J. **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária, 2001.

OLIVEIRA, L. F.; DAMASCENO, C. S.; CAMPOS, R.; SOUZA, Â. M.; MENDES, G. J. A. F.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Chemical composition of the volatile oil of *Croton glandulosus* Linnaeus and its allelopathic activity. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 2020, p. 1-4, 2020.

OLIVEIRA, L. G. A.; BELINELO, V. J.; ALMEIDA, M. S.; AGUILAR, E. B.; VIEIRA FILHO, S. A. Alelopatia de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) na germinação e crescimento inicial de sorgo, pepino e picão preto. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1–10, 2011.

OLIVER-BEVER, B. E. P. Medicinal Plants in Nigeria; Being a Course of Four Lectures, Pharmacy Department of the Nigerian College of Arts, Science and Technology, Ibadan, Nigeria, P. 52- 53, 1960.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

OZCELIK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids flavonoids and phenolic acids. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 49, n. 4, p. 396–402, 2011.

OZKAN, G.; SAGDIC, O.; EKICI, L.; OZTURK, I.; OZCAN, M. M. Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. extract, and its antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Food Lipids**, Trumbull, v. 14, n. 2, p. 157-169, 2007.

ÖZKAY, Ü. D.; CAN, Ö. D. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, Phoenix, v. 109, p. 23-30, 2013.

PALMEIRA JÚNIOR, S. F.; ALVES, V. L.; MOURA, F. S.; VIEIRA, L. F.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 397-402, 2006.

PALMEIRA JUNIOR, S. F.; CONSERVA, L. M.; SILVEIRA, E. R. Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1420-1424, 2005.

PANDA, S. K.; BATISTA, A. K.; DUTTA, S. K. Anticandidal activity of *Croton roxburghii* Balak. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, Sagar, v. 2, p. 55-59, 2010.

PAREDES, A. L.; LUQUE, S.; OLARTE, J. E.; CALLE, J. Caracterización de la fracción responsable del efecto hipotensor del *Croton glabellus*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas**, Bogotá, v. 4, n. 2, p. 1-6, 1985.

PARK, B. H.; FIKRIG, S. M.; SMITHWICK, E. M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostiv acid. **The Lancet**, New York, v. 292, n. 7567, p. 532-534, 1968.

PARK, H. H.; GOOD, R. A. NBT test stimulated. **Lancet**, London, v. 2, n. 7673, p. 616, 1970.

- PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Stuttgart, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.
- PAULA, C. S. **Estudo fitoquímico e propriedades biológicas das folhas de *Bauhinia unguolata* L., Fabaceae**. 2014. 229 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- PAYET, B.; SHUM CHEONG SING, A.; SMADJA, J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 26, p. 10074–10079, 2005.
- PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/US, 2004.
- PHRUEKSANAN, W.; YIBCHOK-ANUN, S.; ADISAKWATTANA, S. Protection of *Clitoria ternatea* flower petal extract against free radical-induced hemolysis and oxidative damage in canine erythrocytes. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 357-363, 2014.
- PIGNATI, W. A.; MACHADO, J. M.; CABRAL, J. F. Acidente rural ampliado: o caso das "chuvas" de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde-MT. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 105-114, 2007.
- PITELLI, R. A. Ecologia de plantas invasoras em pastagens. In: Simpósio sobre ecossistema de pastagens, 1. 1989. Jaboticabal: FUNEP, p. 69-86, 1989.
- PITELLI, R. A. O termo planta-daninha. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 622-623, 2015.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; OBROUCHEVA, N. V.; SEED GERMINATION. A guide to the early stages. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 43, n. 2, p. 210-210, 2000.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, London, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
- PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 4, p. 588–592, 2000.
- PUEBLA, P.; LÓPEZ, J. L.; GUERRERO, M.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M. L.; ROMÁN, L. S.; FELICIANO, A. S. Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeanus*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 551- 555, 2003.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

PUTNAM, A. R.; TANG, C. S. **The science of allelopathy**. New York: Wiley Online Library, 1986.

QUEIROZ, M. M. F.; QUEIROZ, E. F. D.; ZERAIK, M. L.; MARTI, G.; FAVRE-GODAL, Q.; SIMÕES PIRES, C.; LAURENCE, M.; CARRUPT, P. A.; MURIEL, C.; PAULO, M. Q.; BOLZANI, V. da S.; WOLFENDER, J. L. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 10, p. 88-93, 2014.

RADCLIFF-SMITH, A. **Genera Euphobiacearum**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001.
RAMAN, S. T.; GANESHAN, A. K. P. G.; CHEN, C.; JIN, C.; LI, S. H.; CHEN, H. J.; GUI, Z. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of flavonoid extracted from mulberry fruit (*Morus alba* L.). **Pharmacognosy Magazine**, Bangalore, v. 12, n. 46, p. 128, 2016.

RAMOS, J. M. O.; SANTOS, C. A.; SANTANA, D. G.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; THOMAZZI, S. M. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 644-650, 2013.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.

RASOOL, S.; KHAN, F. Z.; UL HASSAN, S.; AHMED, M.; AHMED, M., & TAREEN, R. B. Anticonvulsant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Berberis calliobotrys* Aitch ex Koehne (Berberidaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 14, n. 11, p. 2031-2039, 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REPINE, J. E.; WHITE, J. G.; CLAWSON, C. C.; HOLMES, B. M. The influence of phorbol myristate acetate on oxygen consumption by polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 83, n. 6, p. 911-920, 1974.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2. ed. Orlando: Academic Press, 1984.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, New York, v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RIO, M. C. S.; CASTRO, M. M.; KINOSHITA, L. S. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 339-349, 2002.

RIO, M. C. S.; KINOSHITA, L. S.; CASTRO, M. M. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 713-726, 2005.

RIZVI, S. J. H.; HAQUE, H.; SINGH, V. K.; RIZVI, V. A discipline called allelopathy. In: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (Ed.). **Allelopathy**: Basic and applied aspects. Berlin: Springer Science & Business Media, 1992. p. 1-8.

ROCHA, V.; QUINTINO DA ROCHA, C.; FERREIRA QUEIROZ, E.; MARCOURT, L.; VILEGAS, W.; GRIMALDI, G. B.; FURRER, P.; ALLÉMAN, É.; WOLFENDER, J. L.; SOARES, M. B. P. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 1, p. 1, 2019.

RODRIGUES, G. R.; NASO, D.; CANGERI, F.; PORAWSKI, M.; MARCOLIN, É.; KRETZMANN, N. A.; FERRAZ, A. de B.; RICHTER, M. F.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Treatment with aqueous extract from *Croton cajucara* Benth reduces hepatic oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **BioMed Research International**, New York, v. 2012, p. 1-7, 2012.

RODRIGUES, O. G.; ANGÉLICO, E. C.; DA COSTA, J. G. M.; LUCENA, M. D. F. A.; NETO, V. Q.; SILVA, W. W. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton heliotrapiifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v. 12, n. 3, p. 237-241, 2017.

ROSSI, D.; BRUNI, R.; BIANCHI, N.; CHIARABELLI, C.; GAMBARI, R.; MEDICI, A.; LISTA, A.; PAGANETTO, G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Stuttgart, v. 10, n. 2-3, p. 139-144, 2003.

ROSSI, D.; GUERRINI, A.; MAIETTI, S.; BRUNI, R.; PAGANETTO, G.; POLI, F.; SCALVENZI, L.; RADICE, M.; SARO, K.; SACCHETTI, G. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? **Food Chemistry**, New York, v. 126, n. 3, p. 837-848, 2011.

ROTH, J. A.; KAEBERLE, M. L.; APPELL, L. H.; NACHREINER, R. F. Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 44, n. 2, p. 247-253, 1983.

ROWNTREE, D. **Statistics without tears**: a primer for non-mathematicians. Michigan: Scribner Book Company, 1981.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. D.; MORAIS, S. D.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico**, Fortaleza, p. 1-4, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico**, Fortaleza, p. 1-4, 2007.

SÁ-HAIAD, B.; SERPA-RIBEIRO, A. C. C.; BARBOSA, C. N.; PIZZINI, D.; LEAL, D. O.; SENNA-VALLE, L.; SANTIAGO-FERNANDES, L. D. R. Leaf structure of species from three closely related genera from tribe *Crotoneae dumort.* (Euphorbiaceae ss, Malpighiales). *Plant Systematics and Evolution*, New York, v. 283, n. 3-4, p. 179-202, 2009.

SAHARKHIZ, M. J.; ASHIRI, F.; SALEHI, M. R.; GHAEMGHAMI, J.; MOHAMMADI, S. Allelopathic potential of essential oils from *Carum copticum* L., *Cuminum cyminum* L., *Rosmarinus officinalis* L., and *Zataria multiflora* Boiss. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, Isleworth, v. 31, p. 32–35, 2008.

SAHREEN, S.; KHAN, M. R.; KHAN, R. A. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl₄-induced damage in rat. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, London, v. 11, n. 1, p. 48, 2011.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and pharmacology of *Croton species* (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SALGUEIRO, F. B.; LIRA, A. F.; RUMJANEK, V. M.; CASTRO, R. N. Phenolic composition and antioxidant properties of Brazilian honeys. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 821-826, 2014.

SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. *Vegetação & Flora da Caatinga*. Recife: Associação de Plantas do Nordeste (APNE), Centro Nordestino de Informações sobre Plantas, 2002.

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; CLARK, M.; ANGELES, F. M.; LAO, J.; BUSTAMANTE, S.; MILLER, M. J. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 80, n. 2-3, p. 121-129, 2002.

SANTOS SILVA, P. M.; FIASCHITELO, T. R.; DE QUEIROZ, R. S.; FREEMAN, H. S.; DA COSTA, S. A.; LEO, P.; MONTEMOR, A. F.; DA COSTA, S. M. Natural dye from *Croton urucurana* Baill. bark: extraction, physicochemical characterization, textile dyeing and color fastness properties. *Dyes and Pigments*, London, v. 173, p. 107953, 2020.

SANTOS, A. A.; ARAÚJO, E. G. The effect of PKC activation on the survival of rat retinal ganglion cells in culture. **Brain Research**, Amsterdam, v. 853, n. 2, p. 338-343, 2000.

SANTOS, J. B.; SILVEIRA, T. P.; COELHO, P. S.; COSTA, O. G.; MATTA, P. M.; SILVA, M. B.; DRUMOND NETO, A. P. Interferências de plantas daninhas na cultura do quiabo. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 255-262, 2010.

SANTOS, K. P.; SEDANO-PARTIDA, M. D.; MOTTA, L. B.; CORDEIRO, I.; FURLAN, C. M. Antioxidant activity of flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 1021-1030, 2016.

SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. da S.; ABREU, C. M. P. de; GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SANTOS, P. M.; SCHRIPEMA, J.; KUSTER, R. Flavonoides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, p. 321-325, 2005.

SARAVANAN, R.; VISWANATHAN, P.; PUGALENDI, K. V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. **Life Sciences**, Ōsaka-shi, v. 78, n. 7, p. 713-718, 2006.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família *Euphorbiaceae* nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 99-118, 2008.

SAUSEN, T. L.; LÖWE, T. R.; FIGUEIREDO, L. S.; BUZATTO, C. R. Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso. **Polibotânica**, México, v. 27, p. 145-158, 2009.

SAVIETTO, J. P.; FURLAN, C. M.; MOTTA, L. B.; SALATINO, M. L. F.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T.; SALATINO, A.; SANTOS, D. Y. A. Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 662-667, 2013.

SCRIVANTI, L. R. Allelopathic potential of *Bothriochloa laguroides* var. *laguroides* (DC.) Herter (Poaceae: Andropogoneae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, Jena, v. 205, n. 5, p. 302-305, 2010.

SECCO, R. S.; CORDEIRO, I.; SENNA-VALE, L.; SALES, M. F.; LIMA, L. R.; MEDEIROS, D.; HAIAD, B. S.; OLIVEIRA, A. S.; CARUZO, M. B. R.; CARNEIRO TORRES, D.; BIGIO, N. C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l. in Brazil, **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 1, p. 227-242, 2012.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, London, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEGAT, G. C.; MANJAVACHI, M. N.; MATIAS, D. O.; PASSOS, G. F.; FREITAS, C. S.; COSTA, R.; CALIXTO, J. B. Antiallodynic effect of β -caryophyllene on paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 125, p. 207-219, 2017.

SETZER, W. N.; STOKES, S. L.; BANSAL, A.; HABER, W. A.; CAFFREY, C. R.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H. Chemical composition and cruzain inhibitory activity of *Croton draco* bark essential oil from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 2, n. 6, p. 1934578X0700200613, 2007.

SHAHWAR, D.; AHMAD, N.; YASMEEN, A.; KHAN, M. A.; ULLAH, S.; ATTA-UR, R. Bioactive constituents from *Croton sparsiflorus* Morong. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 29, n. 3, p. 274-276, 2015.

SHARMA, N.; SHUKLA, S. Hepatoprotective potential of aqueous extract of *Butea monosperma* against CCl₄ induced damage in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Jena, v. 63, n. 7-8, p. 671-676, 2011.

SHARMA, P.; AMIT, J.; PARAS, S.; KAUSHIK, S. Evaluation of phenolic & flavonoid profile and screening of antioxidant activity of plant *Croton sparsiflorus* by bio autographic method. **Journal of Pharmacy Research**, Bangalore, v. 3, n. 35, p. 1146–1148, 2010.

SHINWARI, M. I.; IIDA, O. S. A. M. U.; SHINWARI, M. I.; FUJII, Y. Evaluation of phytodiversity for allelopathic activity and application to minimize climate change impact: Japanese medicinal plants. **Pakistan Journal of Botani**, Karachi, v. 49, p. 139-144, 2017.

SHON, M. Y.; CHOI, S. D.; KAHNG, G. G.; NAM, S. H.; SUNG, N. J. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 659-666, 2004.

SIBBR. *Croton glandulosus* in **Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira**. Disponível em:

<https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/croton_glandulosus>. Acesso em: 13 nov. 2018.

SILVA ALMEIDA, J. R. G.; DE OLIVEIRA, A. P.; DOS SANTOS, U. S.; DE SOUZA, M. D.; DOS PASSOS BISPO, L.; TURATTI, I. C. C.; LOPES, N. P. Chemical composition of essential oils from the stem barks of *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) native to the Caatinga biome. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Lagos, v. 9, n. 4, p. 98-101, 2015.

SILVA BRITO, S. S.; SILVA, F.; MALHEIRO, R.; BAPTISTA, P.; PEREIRA, J. A. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 113, p. 308-315, 2018.

SILVA, C. B.; RECH, K. S.; OCAMPOS, F. M. M.; DALARMI, L.; JASINSKI, V. C. G.; DIAS, J. F. G.; ZANIN, S. M. W.; KERBER, V. A.; KULIK, J. D.; FUJIWARA, G. M.; OLIVEIRA, M. de; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. *Byrsonima intermedia* preparations inhibits trypsin and chymotrypsin activities from *Aedes aegypti* larval gut. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 8, n. 9, p. 416–422, 2014.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A. D.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T.; OLIVEIRA, E. D.; ZANELLA, R.; NOLDIN, J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2383-2389, 2009.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada às cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 347-356, 2007

- SILVA, J. A. G.; LIMA, I. R.; SANTANA, M. A. N.; DA SILVA, T. M. S.; SILVA, M. I. D. A. G.; LEITE, S. P. *Screening* fitoquímico e avaliação da toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 3, p. 934-941, 2017.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010a.
- SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas do Cerrado da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010b.
- SIMIONATTO, E.; BONANI, V. F. L.; MOREL, A. F.; POPPI, N. R.; RAPOSO JÚNIOR, J. L.; STUKER, C. Z.; PERUZZO, G. M.; PERES, M. T. L. P.; HESS, S. C. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 879–885, 2007.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. São Paulo: Artmed Editora, 2017.
- SISODIA, S.; SIDDIQUI, M. B. Allelopathic effect by aqueous extracts of different parts of *Croton bonplandianum* Baill. on some crop and weed plants. **Journal of Agricultural Extension and Rural Development**, Nairobi, v. 2, n. 1, p. 22–28, 2010.
- SMERIGLIO, A.; RAGUSA, S.; MONFORTE, M. T.; D'ANGELO, V.; CIRCOSTA, C. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Euphorbia dendroides* L.(Euphorbiaceae) latex. **Plant Biosystems**, Bologna, v. 153, n. 4, p. 498-505, 2019.
- SOBEH, M.; MAHMOUD, M. F.; HASAN, R. A.; ABDELFATTAH, M. A.; SABRY, O. M.; GHAREEB, M. A.; EL-SHAZLY, A. S.; WINK, M. Tannin-rich extracts from *Lannea stuhlmannii* and *Lannea humilis* (Anacardiaceae) exhibit hepatoprotective activities *in vivo* via enhancement of the anti-apoptotic protein Bcl-2. **Scientific reports**, Nagoya, v. 8, n. 1, p. 9343, 2018.
- SODRÉ, R. C.; SILVA, M.; SALES, M. *Croton* L.(Euphorbiaceae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 1, p. 221-234, 2014.
- SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; ANDERSON, M. M.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, J. D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Medica**, Stuttgart, v. 59, n. 03, p. 250-252, 1993.
- SOMASAGARA, R. R.; HEGDE, M.; CHIRUVELLA, K. K.; MUSINI, A.; CHOUDHARY, B.; RAGHAVAN, S. C. Extracts of strawberry fruits induce intrinsic pathway of apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor progression in mice. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. e47021, 2012.

SOMASEGAR, S.; LI, L.; THOMPSON, C. L. No association of reproductive risk factors with breast cancer tumor grade. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 140-143, 2018.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C. Allelopathic effects of calopo according to its age and to seed density of the receiver plant. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2; p. 211-218, 2003.

SOUZA, A. M.; ARMSTRONG, L.; MONTEIRO, C. L. B.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. *In vitro* effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Lagos, v. 8, n. 35, p. 862-867, 2014.

SOUZA, P. H. S. **Potencial de extratos da *Schinopsis brasiliensis* Engl. Para desenvolvimento de produtos odontológicos**. 2015. 137f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia Ilustrado para identificação das famílias de angiosperma da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SEVERI, J. A.; RODRIGUES, E. R.; DE PAULA, M. I.; FREITAS, J. A.; VILEGAS, W.; PIETRO, R. C. Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) with antifungal activity. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 33, n. 17, p. 2579-2582, 2019.

SPARG, S.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, n. 2, p. 219-243, 2004.

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 15, n. 1, p.15–21, 2011.

STEIN, A. C.; ÁLVAREZ, S.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 107, n. 1, p. 95-98, 2006.

SUBHASWARAJ, P.; SOWMYA, M.; BHAVANA, V.; DYAVAIAH, M.; SIDDHARDHA, B. Determination of antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* and *Croton caudatus* in *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 54, n. 9, p. 2728-2736, 2017.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n. 1, p. 99-102, 2006.

TCHANGOUE, Y. A. N.; TCHAMGOUE, J.; LUNGA, P. K.; KNEPPER, J.; PALTINEAN, R.; IBROM, K.; CRISAN, G.; KOUAM, S. F.; ALI, M. S.; SCHULZ, S. Antibacterial phloroglucinols derivatives from the leaves of *Mallotus oppositifolius* (Geisler) Müll. Arg.(Euphorbiaceae). **Fitoterapia**, Milano, v. 142, p. 104527, 2020.

TÉDONG, L.; DZEUFUET, P. D. D.; DIMO, T.; ASONGALEM, E. A.; SOKENG, S. D.; FLEJOU, J. F.; CALLARD, P.; KAMTCHOING, P. Acute and subchronic toxicity of *Anacardium occidentale* Linn (Anacardiaceae) leaves hexane extract in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, Ile-Ife, v. 4, n. 2, p. 140-147, 2007.

TENE, M.; NDONTSA, B. L.; TANE, P.; DE DIEU TAMOKOU, J.; KUIATE, J. R. Antimicrobial diterpenoids and triterpenoids from the stem bark of *Croton macrostachys*. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, Dschang, v. 3, n. 3, p. 538-544, 2009.

TEODORO, G. R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C. J.; AND KOGA-ITO, C. Y. Potential use of phenolic acids as anti-candida agents: a review. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1420, 2015.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 6-7, p. 669–675, 2006.

THE PLANT LIST. Version 1.1. Disponível em:
<<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-49985>>. Acesso em: 05 março 2017.

THOMAS, L.; PECK, J. L. Hemolysis with human complement, human cells, and tannic acid: application to complement fixation test. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 67, n. 4, p. 475-478, 1948.

TIAN, J. L.; YAO, G. D.; WANG, Y. X.; GAO, P. Y.; WANG, D.; LI, L. Z.; LIN, B.; HUANG, X. X.; SONG, S. J. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 1237-1242, 2017.

TOAQUIZA AGUAGALLO, C.; TIGSE MOPOSITA, C.; ESCUDERO VILEMA, E.; MIRANDA BARROS, A.; GUANGASIG TOAPANTA, V. Evaluación de la actividad cicatrizante de hierba mosquera (*Croton elegans* Kunth) en ratones (*Mus musculus*). **Perfiles**, Chimborazo, v. 1, n. 21, p. 20-25, 2019.

TORRES, D. S. C. **Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma caatinga**. 2009. 295 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

TORRES, M. C. M.; ASSUNÇÃO, J. C.; SANTIAGO, G. M. P.; ANDRADE-NETO, M.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; MARINHO FILHO, J. D. B.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L. Larvicidal and nematocidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v. 5, n. 12, p. 2724-2728, 2008.

TREASE, G. E; EVANS, W. C. Textbook of Pharmacognosy. 15th edition. Saunders Publishers, London, pag. 42-44, 221-229, 246-249, 304-306, 331-332, 391-393, 2002. Tropical Plants Database, Ken Fern. tropical.theferns.info. 2018-11-13. <[tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Croton +glandulosus](http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Croton+glandulosus)>

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 8, n. 4, p. 399, 2008.

TUR, C. M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum*. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 2, p. 13-22, 2010.

URRUTIA-HERNÁNDEZ, T. A.; SANTOS-LÓPEZ, J. A.; BENEDÍ, J.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J.; VELÁZQUEZ-GONZÁLEZ, C.; LA O-ARCINIEGA, D., JARAMILLO-MORALES, O. A.; BAUTISTA, M. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of *Croton hypoleucus* Extract in an Induced-Necrosis Model in Rats. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 14, p. 2533, 2019.

USDA - United States Departamento of Agriculture. **Natural Resouces Conservation Service**. *Croton glandulosus* L. var. *lindheimeri* Müll. Arg. Lindheimer's croton. Disponível em: <[https:// plants.usda.gov/core/profile?symbol=CRGLL](https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CRGLL)>. Acesso em: 13 nov. 2018.

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A.; SIANI, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 216– 223, 2006.

VASCONCELOS, M. C. C.; SILVA, A. F. A.; LIMA, R. S. Interferência de plantas daninhas sobre plantas cultivadas. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2012.

VEIGA JUNIOR, V. ; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V. D.; HENRIQUES, M. D. G. M. D. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.

VENTURINI, C. L.; MACHO, A.; ARUNACHALAM, K.; DE ALMEIDA, D. A. T.; ROSA, S. I. G.; PAVAN, E.; BALOGUN, S. O.; DAMAZO, A. S.; MARTINS, D. T. de O. Vitexin inhibits inflammation in murine ovalbumin-induced allergic asthma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 97, p. 143-151, 2018.

VERMA, A. K.; SINGH, H.; SATYANARAYANA, M.; SRIVASTAVA, S. P.; TIWARI, P.; SINGH, A. B.; DWIVEDI, A. K.; SINGH, S. K.; SRIVASTAVA, M.; NATH, C.; RAGHUBIR, R.; SRIVASTAVA, A. K.; PRATAP, R. Flavone-based novel antidiabetic and antidyslipidemic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 55, n. 10, p. 4551-4567, 2012.

VIDAL, C. S.; MARTINS, A. O. B. P. B.; DE ALENCAR SILVA, A.; DE OLIVEIRA, M. R. C.; RIBEIRO-FILHO, J.; DE ALBUQUERQUE, T. R.; COUTINHO, H. D. M.; DA SILVA ALMEIDA, J. R. G.; QUINTANS JUNIOR, L. J.; DE MENEZES, I. R. A. Gastroprotective effect and mechanism of action of *Croton rhamnifolioides* essential oil in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 89, p. 47-55, 2017.

VIECELLI, C. A.; CRUZ-SILVA, C. T. A. Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de Sálvia. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 39-46, 2009.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 326-337, 2006.

VILLASENOR, I. M. Bioactivities of iridoids. **Anti-Inflammatory & Anti Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 6, n. 4, p. 307-314, 2007.

VIVEROS-PAREDES, J. M.; GONZÁLEZ-CASTAÑEDA, R. E.; GERTSCH, J.; CHAPARRO-HUERTA, V.; LÓPEZ-ROA, R. I.; VÁZQUEZ-VALLS, E.; ... FLORES-SOTO, M. E. Neuroprotective effects of β -caryophyllene against dopaminergic neuron injury in a murine model of parkinson's disease induced by MPTP. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 10, n. 3, p. 60, 2017.

VOLL, E. **Dinâmica das plantas daninhas e práticas de manejo**. Londrina: Embrapa Soja, 2005.

VUNDA, S. L. L.; SAUTER, I. P.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; BORDIGNON, S. A. L.; ROTT, M. B.; APEL, M. A.; VON POSER, G. L. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 3, p. 961-966, 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 1996.

WAGNER, H.; HORHAMMER, L.; KIRALY, I. C. Flavon-C-glycoside in *Croton zambezicus*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 897, 1970.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal for Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 51, n. 1-3, p. 239-254, 1996.

WANG, J.; YUE, Y. D.; JIANG, H.; TANG, F. Rapid *screening* for flavone C-glycosides in the leaves of different species of bamboo and simultaneous quantitation of four marker compounds by HPLC UV/DAD. **International Journal of Analytical Chemistry**, Cairo, v. 2012, p. 1-8, 2012.

WANG, J.; ZHENG, X.; ZENG, G.; ZHOU, Y.; YUAN, H. Purified vitexin compound 1 inhibits growth and angiogenesis through activation of FOXO3a by inactivation of Akt in hepatocellular carcinoma. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 33, n. 2, p. 441-448, 2014.

WANG, Q.; LUO, J.; LIU, H.; BRENNAN, C. S.; LIU, J.; ZOU, X. Protective effects of the flavonoid fraction obtained from pomelo fruitlets through ultrasonic-associated microwave

extraction against AAPH-induced erythrocyte hemolysis. **RSC Advances**, Cambridge, v. 9, n. 28, p. 16007-16017, 2019.

WANG, W.; CHENG, H.; GU, X.; YIN, X. The natural flavonoid glycoside vitexin displays preclinical antitumor activity by suppressing NF- κ B signaling in nasopharyngeal carcinoma. **OncoTargets and Therapy**, Auckland v. 12, p. 4461, 2019.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de cleverger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 1-112, 1963.

WEBER, U. S.; STEFFEN, B.; SIEGERS, C. P. Antitumor-activities of coumarin, 7 hydroxy-coumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v. 99, n. 2, p. 193-206, 1998.

WEBSTER, G. L. Irritant plants in the spurge family (Euphorbiaceae). **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 4, n. 2, p. 36-45, 1986.

WEBSTER, G. L. Systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Gardem**. Califórnia, v. 81, n. 1, p. 144, 1994.

WIJESEKERA, K. A bioactive diterpene; Nasimalum A from *Croton oblongifolius* Roxb. **Prayogik Rasayan**, New Delhi, v. 1, p. 41-44, 2017.

WONG, K. E.; MORA, M. C.; SULTANA, N.; MORIARTY, K. P.; ARENAS, R. B.; YADAVA, N.; SCHNEIDER, S. S.; TIRABASSI, M. V. Evaluation of *Rhodiola crenulata* on growth and metabolism of NB-1691, an MYCN-amplified neuroblastoma cell line. **Tumor Biology**, Basel, v. 40, n. 6, p. 1010428318779515, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue**: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Genève: WHO, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Genève: WHO, 1992

WURDACK, K. J.; HOFFMANN, P.; CHASE, M. W. Molecular phylogenetics analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid rbcL and trnL-F DNA sequences. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 1397-1420, 2005.

WU-ZHANG, A. X.; NEWTON, A. C. Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. **Biochemical Journal**, London, v. 452, n. 2, p. 195-209, 2013.

XIAO, J.; CAPANOGLU, E.; JASSBI, A. R.; AND MIRON, A. Advance on the flavonoid c glycosides and health benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 56, n.1, p. 29-45, 2016.

XIAO, J.; CHEN, T.; CAO, H. WITHDRAWN: Flavonoid glycosylation and biological benefits. **Biotechnology Advances**, Oxford, article in press, 2014.

XIE, J.; LIN, Y. S.; SHI, X. J.; ZHU, X. Y.; SU, W. K.; WANG, P. Mechanochemical-assisted extraction of flavonoids from bamboo (*Phyllostachys edulis*) leaves. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 43, p. 276-282, 2013.

XU, W.; LI, T.; QIU, J. F.; WU, S. S.; HUANG, M. Q.; LIN, L. G.; ZHANG, Q. W.; CHEN, X. P.; LU, J. J. Anti proliferative activities of terpenoids isolated from *Alisma orientalis* and their structure activity relationships. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 15, n. 2, p. 228-235, 2015.

YILMAZ, A.; BOGA, M.; TOPÇU, G. Novel terpenoids with potential anti alzheimer activity from *Nepeta obtusicrena*. **Records of Natural Products**, Turkey, v. 10, n. 5, p. 530, 2016.

YUN, K. W.; KIL, B. S.; HAN, D. M. Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile constituents of *Artemisia princeps* var. *orientalis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 11, p. 2757-2766, 1993.

ZAYEDE, D.; MULAW, T.; KAHALIW, W. Antidiarrheal Activity of Hydromethanolic Root Extract and Solvent Fractions of *Clusia abyssinica* Jaub. & Spach.(Euphorbiaceae) in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2020, 2020.

ZHANG, D. D.; ZHOU, B.; YU, J. H.; XU, C. H.; DING, J.; ZHANG, H.; YUE, J. M. Cytotoxic tiglane-type diterpenoids from *Croton tiglium*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 71, n. 52, p. 9638-9644, 2015.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese Medicine**, New York, v. 13, n. 1, p. 20, 2018.

ZHANG, Y.; BAO, B.; LU, B.; REN, Y.; TIE, X.; ZHANG, Y. Determination of flavone C-glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. **Journal of Chromatography. A**, Amsterdam, v. 1065, n. 2, p. 177-185, 2005.

ZHAO, Q. Q.; WANG, S. F.; LI, Y.; SONG, Q. Y.; GAO, K. Terpenoids with anti inflammatory activity from *Abies chensiensis*. **Fitoterapia**, Milano, v. 111, p. 87-94, 2016.

ZHOU, D.; LI, Y.; CHEN, G.; YANG, Y.; MI, Y.; LIN, B.; LI, W.; HOU, Y.; LI, N. Structural elucidation and anti-neuroinflammatory activities of lignans from the testas of *Vernicia montana*. **Bioorganic Chemistry**, New York, v. 97, p. 103690, 2020.

ZIELIŃSKI, H.; KOZŁOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 6, p. 2008–2016, 2000.

ZOU, G. A.; SU, Z. H.; ZHANG, H. W.; WANG, Y.; YANG, J. S.; ZOU, Z. M. Flavonoids from the stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 3, p. 1097-1102, 2010.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, New York, v. 114, n. 1, p. 310-316, 2009.

ANEXO 1

APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA 23075.027346/2013-18



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 719

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.027346/2013-18

APROVADO: 11/07/2013 – R.O. 06/2013

TÍTULO: Ecologia e controle de Culicidae (Diptera) de relevância em saúde pública

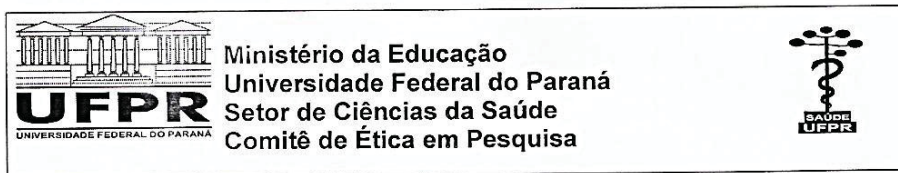
AUTORES: Mario Antonio Navarro da Silva, Anna Julia Pietrobon, Oscar Alexandre Aguirre Obando

DEPARTAMENTO: Zoologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA

ANEXO 2

APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA CEP/SD 1033.158.10.11



Curitiba, 01 de fevereiro de 2011

Ilmo (a) Sr. (a)
Obdulio Gomes Miguel
Josiane de Fátima Gaspari Dias

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Estudo de produtos naturais sobre a função dos neutrófilos humanos”** está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 01 de dezembro de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 01 de fevereiro de 2011.


Registro CEP/SD: 1033.158.10.11

CAAE: 0090.0.091.000-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 01/08/2011.

Atenciosamente


Prof.ª. Dr.ª. Ida Cristina Gubert
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

ANEXO 3

APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA: 23075.219908/2017-73



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1148

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.219908/2017-73


APROVADO/APPROVAL: 27/02/2018 – R.O. 01/2018

TÍTULO: Avaliação química, morfoanatômica e de atividades antioxidantes e biológicas das partes aéreas de *Croton glandulosus* Lindheimeri.

TITLE: Chemical and morphanatomic evaluation, and antioxidant and biological activities of the aerial parts from *Croton glandulosus* Lindheimeri.

AUTORES/AUTHORS: Marilis Dallarmi Miguel, Letícia Freire de Oliveira, Alexandra Acco, Eliana Rezende Adami.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmácia



Prof. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA